

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

DIOGO PERES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS EM BIORREATOR DE FIBRA OCA**

SÃO CARLOS

2013

**AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS EM BIORREATOR DE FIBRA OCA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

DIOGO PERES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS EM BIORREATOR DE FIBRA OCA**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química para obtenção
do título de mestre em Engenharia
Química. Área de concentração:
Pesquisa e desenvolvimento de
processos químicos
*Orientação: Prof. Dr. Claudio Alberto
Torres Suazo***

SÃO CARLOS

2013

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

S237ae

Santos, Diogo Peres dos.

Avaliação da expansão de células estromais mesenquimais em biorreator de fibra oca / Diogo Peres dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
94 f.

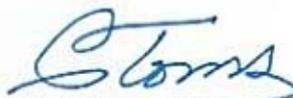
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Engenharia bioquímica. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Biorreator de fibra oca. 4. Proliferação de células. I. Título.

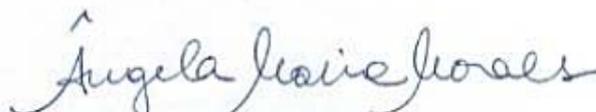
CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
DIOGO PERES DOS SANTOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 28 DE FEVEREIRO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



Claudio Alberto Torres Suazo
Orientador, UFSCar



Angela Maria Moraes
UNICAMP



Alberto Colli Badino Junior
UFSCar

Dedico este trabalho à incrível mulher que me
educou a seguir os meus sonhos, buscando
sempre ser feliz no que faço,
minha amada mãe.

“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Domingos Peres dos Santos e Leonilda Rosa de Oliveira, pelo afeto e carinho incondicionais, devo tudo que sou e serei à vocês.

Ao meu irmão, Daniel Peres dos Santos, pelo apoio e companheirismo constantes em todas as fases de minha vida.

Aos meus tios, Valdir Rodrigues Froes e Luzia dos Reis dos Santos Froes, e primos, Vanessa dos Santos Froes e Vitor dos Santos Froes, pelo carinho ao me acolher em São Carlos.

À minha namorada, Cibele dos Santos Borges, pelo amor e suporte, com a sua confiança sempre me sinto mais forte.

Ao Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo, pela confiança na minha capacidade e suporte constante durante todo o período do mestrado.

Aos colegas de laboratório, Ana Cláudia Ruela, Genoveva Flores Luna, Gizella Potrich Leal Maymone, Marlei Leandro de Mendonça, Paula de Camargo Bertuso, Thaila Isabel Wodewotzky e Tiago Hoerbe Degrandi, por proporcionarem um ambiente agradável de trabalho.

À M^a. Amanda Mizukami pelo auxílio na minha caminhada de seguir a linha de pesquisa do biorreator de fibra oca.

Aos meus colegas da pós-graduação, Agnes Cristina Olivera Mafra, Aline de Holanda Rosanova, Gil César Pereira Franco, Guilherme da Silveira de Moraes, Marcelo Henrique da Silva, Mauricio Possedente dos Santos, Mayerlenis Jimenez Rojas, Patrícia Marina de Aquino, Paula Cristina de Paula Caldas, Samirys Sara Rodrigues Cirqueira e Sara Mansour, pela companhia nas disciplinas.

Aos meus amigos, Eduardo Salomão Sanches, Renato Guimarães Andrade e Rafael Augusto Sotana de Souza, pelo apoio e companheirismo mesmo que distantes.

Aos técnicos, Amadeus Gomes de Azevedo e Edilson de Almeida, pela ajuda na realização deste trabalho.

À Prof^a Ângela Maria Moraes pela participação na defesa e suas sugestões sobre o trabalho

Ao Prof. Alberto Colli Badino Júnior pela participação na defesa e suas sugestões sobre o trabalho

Ao Prof. Adilson José da Silva pela participação na qualificação e suas sugestões sobre o trabalho.

À Prof^a. Teresa Cristina Zangirolami pela participação na qualificação e suas sugestões sobre o trabalho.

Ao Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza pela ajuda prestada na metodologia laboratorial.

Ao Prof. Dr. José Teixeira Freire pelo conhecimento transmitido e pelo modelo de vida acadêmica.

Ao Prof. Ruy de Souza Júnior pelo auxílio na modelagem matemática.

Aos demais Professores do programa de pós-graduação em engenharia química da UFSCar, São Carlos, pela oportunidade e auxílio.

Aos funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto-USP pela ajuda e por compartilhar o conhecimento.

Às secretárias, Alcione Francisco de Almeida, Evelyn Domingues e Raquel Ferreira dos Santos Diniz, pelo auxílio e eficiência.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao FINEP e BNDES pelo suporte financeiro.

À Deus, por tudo que me foi concedido.

RESUMO

A utilização de células estromais mesenquimais (MSCs em inglês) para a terapia clínica tem sido limitada pela baixa quantidade de células que podem ser obtidas diretamente do tecido, tornando necessário o desenvolvimento de técnicas de expansão do número de células *in vitro*. Os métodos atuais de expansão apresentam necessidade de intensa mão de obra, ambientes desfavoráveis para o crescimento celular, níveis de expansão ainda modestos e baixo rendimento na recuperação destas células. Na procura de melhores alternativas, diversos tipos de biorreatores vêm sendo avaliados, porém, com resultados ainda discretos. Um sistema pouco estudado que tem se mostrado muito eficiente no uso com outros tipos de células animais é o biorreator de fibra oca. Este biorreator apresenta ambiente de cultura relativamente homogêneo, baixo nível de forças hidrodinâmicas sobre as células e o controle do processo é feito através de manipulação externa à cultura. Assim, é proposto neste trabalho o estudo da expansão *in vitro* de MSCs num protótipo de biorreator de fibra oca de 15 mL projetado e construído com uma configuração especialmente concebida para expansão de MSCs a serem utilizadas em aplicações terapêuticas. O inóculo foi preparado com MSCs pré-cultivadas aderidas ao microcarregador Cultispher-S na concentração de 4 g/L em frasco spinner contendo 50 mL de meio de cultura α -MEM com 15% v/v de soro fetal bovino. O pré-cultivo foi realizado em incubadora de CO₂ a pH próximo a 7,3 e temperatura de 37°C. Para os cultivos de expansão no biorreator foi utilizado o mesmo meio de cultura, com adição de 12 g/L de alginato e 4,25-4,50 mM de CaCl₂ como agentes geleificantes para imobilizar e manter suspensos os microcarregadores, nas condições de pH e temperatura utilizadas no pré-cultivo. A oxigenação do meio de cultura continuamente recirculado pelo espaço intracapilar foi realizada mediante borbulhamento de ar em um frasco externo. Os níveis de oxigenação foram de 70 a 90% da saturação com ar. Os resultados experimentais obtidos mostram que a configuração utilizada propiciou boas condições para a expansão sem agregação celular das MSCs, chegando-se a fatores de expansão estimados de 15,3 vezes e níveis de recuperação de células de 82%. Esses resultados também evidenciam a possibilidade de melhora da eficiência da expansão das MSCs através da renovação do meio de cultivo para a manutenção de níveis adequados de arginina, nutriente presente em quantidades limitantes, e amônia, metabólito inibidor de crescimento.

Palavras-Chave: Células estromais mesenquimais. Crescimento celular. Biorreator. Fibra oca. Microcarregador.

ABSTRACT

The use of mesenchymal stromal cells (MSCs) for clinical therapy has been limited by the low amount of cells that can be obtained directly from tissue, making it necessary to develop techniques for *in vitro* cell number expansion. The current methods of expansion are labor-intensive, exhibit unfavorable environments for cell growth, show still modest levels of expansion and low yield in the recovery of these cells. In the search for better alternatives, several types of bioreactors have been assessed, however, with results still discreet. A little-studied system, which has showed itself very effective in the use with other types of animal cells, is the hollow fiber bioreactor. This bioreactor has relatively homogeneous culture environment, low level of hydrodynamic stress on cells and the process control is made through manipulation external to the culture. Thus, it is proposed in this work the study of the *in vitro* expansion of MSCs in 15 mL hollow fiber prototype bioreactor designed and built with a configuration specifically conceived for expansion of MSCs for use in therapeutic applications. The inoculum was prepared with MSCs precultured adhered to microcarrier Cultispher-S at concentration of 4 g/L in spinner flask containing 50 mL of α -MEM culture medium with 15% v/v fetal bovine serum. The preculture was performed in CO₂ incubator at pH close to 7.3 and temperature of 37°C. For bioreactor expansion cultures, it was used the same culture medium, with addition of 12 g/L of alginate and 4.25-4.50 mM of CaCl₂ as gelling agents to immobilize and keep in suspension the microcarriers, in the conditions of pH and temperature used in the preculture. The oxygenation of the culture medium continuously recirculated through the intracapilar space was carried out by air bubbling in an external flask. The oxygenation levels were of 70 to 90% of saturation with air. The experimental results obtained show that the used configuration of hollow fiber bioreactor promoted good conditions for expansion of MSCs without cell aggregation, reaching 15.3-fold expansion and cell recovery levels of 82%. These results also demonstrate the possibility of improving the efficiency of MSCs expansion through the renewal of medium to maintain suitable levels of arginine, nutrient present in limiting amounts, and ammonium, growth inhibitor metabolite.

Keywords: Mesenchymal stromal cells. Cell growth. Bioreactor. Hollow fiber. Microcarrier.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parâmetros de processos críticos influenciando a expansão e/ou diferenciação de células-tronco em biorreatores.....	19
Figura 2 – Processo Mesengênico.	25
Figura 3 - Microcarregador Cultispher-S sem células (A), com células estromais de ratos (B) Barra de escala = 40 µm.	28
Figura 4 - Classificação de biorreatores e exemplos destes.	30
Figura 5 - Exemplo de um frasco spinner.....	31
Figura 6 - Diagrama esquemático de um biorreator de paredes rotativas.	32
Figura 7 - Biorreator com agitação induzida por ondas.	32
Figura 8 - Esquema representativo de um biorreator de placas paralelas.	33
Figura 9 - Diagrama esquemático de um sistema do biorreator de leito fixo.	34
Figura 10 - Esquema de um biorreator de fibra oca.	35
Figura 11 - Diagrama esquemático de um biorreator de fibra oca para a engenharia de tecidos. As fibras ocas são embutidas paralelamente uma a outra dentro do material de suporte e a estrutura toda está presa em um invólucro externo. Células são inoculadas fora das fibras ocas e os nutrientes que fluem no interior da fibra podem difundir para fora através das paredes porosas das fibras para alimentar as células. Os resíduos do metabolismo celular podem também permear para o interior da fibra oca e serem removidos.....	35
Figura 12 - Típico biorreator de perfusão de fibra oca automatizado (FiberCell®).	36
Figura 13 - Imagens coradas de MTT (A) e DAPI (B) de partículas de Cultisher S durante o tempo de cultivo em frasco spinner.	37
Figura 14 - Sistema de biorreator de leito fixo de 300 cm ³	39
Figura 15 - Microscopia de contraste de fase mostrando a evolução no tempo da agregação de 25000 MSCs humanas em um esferoide (Barra de escala - 500 µm).....	41
Figura 16 - Sistema de cocultivo hematopoiético em biorreator de fibra oca.....	42
Figura 17 – Quantum® Cell Expansion System. O sistema automatizado permite maior segurança contra contaminações e menor necessidade de mão-de-obra. O sistema também possui um mecanismo de rotação central do cartudho de fibra oca para homogeneizar as células na fase de adesão.	42
Figura 18 – Modulo comercial de filtração tangencial com aproximadamente 60 fibras ocas.	46

Figura 19 – Modulo comercial cortado e fibras ocas retiradas do seu interior.....	46
Figura 20 - Tubo de policarbonato, fibras ocas soltas, dutos de policarbonato para a entrada do EEC e discos de policarbonato para uniformização da distância entre fibras.....	46
Figura 21 - Colagem de dutos de policarbonatos e introdução de um conjunto de 19 fibras ocas no interior do tubo.	47
Figura 22 - Processo de colagem das fibras ocas. Vista superior (A) e vista lateral (B) das fibras recém coladas, vista lateral (C) e vista frontal (D) do cilindro com as fibras cortadas. .	47
Figura 23 - Biorreator montado com flanges de aço com vedação para escoamento do meio de cultura pelo espaço intracapilar.....	47
Figura 24 - Esquema completo de cultivo das células hMSC-TERT para realização de experimentos com o biorreator de fibra oca.	49
Figura 25 – Esquema do cultivo utilizando o biorreator de fibra oca e seus acessórios. Este conjunto era colocado em incubadora de CO ₂ para manter a temperatura constante (37°C) durante o cultivo.	50
Figura 26 - Sistema de cultivo em biorreator de fibra oca no interior de uma incubadora de CO ₂ para manutenção da temperatura constante (37°C) durante o cultivo.	50
Figura 27 – Esquema do processo difusivo de nutrientes (representado pelo oxigênio) e metabólitos na região entre duas fibras ocas no EEC.....	56
Figura 28 - Perfis de concentração de oxigênio entre duas fibras ocas no EEC do biorreator em diferentes valores de concentração celular, sendo a distância entre fibras de 1 (A), 2 (B) e 3 mm (C). A concentração celular do inóculo (1X) é de $6,75 \times 10^6$ células/ volume do EEC. $C_{OL} = 1,4 \times 10^{-7}$ moles de O ₂ /cm ³	60
Figura 29 - Resultados do experimento 1 realizados em placas de poliestireno de 24 poços tratadas para promover a adesão celular. No cultivo utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino com inóculo de 2×10^4 células/mL em incubadora com 5% de CO ₂ e temperatura de 37°C. O número de células foi determinado pela contagem em hemacitômetro e a quantificação de nutrientes através de medidas no bioanalisador YSI-7100 MBS. Os valores apresentados são a média e desvio padrão obtido da utilização da amostragem de 3 poços por dia.	62
Figura 30 - Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{x/gli}$ e $Y_{x/gln}$ utilizando dados da linhagem hMSC-TERT cultivada em meio de cultura α -MEM em placas de 24 poços em incubadora com 5% de CO ₂ a 37°C. Os dados de cultivos são os apresentados na Figura 26. Os valores de $Y_{x/gli}$ e $Y_{x/gln}$ foram calculados a partir da inclinação das relações lineares	

obtidas para ambos os substratos. Os pontos no gráfico são as médias e desvio padrão de medidas realizadas em triplicata..... 63

Figura 31 - Resultados obtidos no Experimento 2 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 72 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. No cultivo utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas foi estimado através da metodologia do MTT. O pH foi determinado com eletrodo padrão..... 64

Figura 32 - Resultados obtidos no Experimento 3 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 48 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. No cultivo utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas foi obtido através da metodologia do MTT. O pH foi determinado com eletrodo padrão..... 65

Figura 33 - Resultados obtidos no Experimento 4 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 48 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas durante o cultivo em biorreator de fibra oca foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4. 13. O pH foi determinado com eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. 66

Figura 34 – Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 4. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL. 66

Figura 35 - Resultados obtidos no Experimento 5 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 48 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. A rotação do rolete da bomba foi variado ao longo do experimento (1 = de 15 para 30 rpm; 2 = de 30 para 50 rpm; 3 = de 50 para 70 rpm e 4 = de 70 para 85 rpm). Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas durante o cultivo em biorreator de fibra oca foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4. 13. O pH foi determinado com

eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. As setas vermelhas indicam a troca de 25% do meio de cultura. 67

Figura 36 - Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 5. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra oca, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL. 68

Figura 37 - Fotos dos microcarregadores com células ativas expressando GFP do experimento 5. (A) 8 horas de cultivo. (B) 48 horas de cultivo. (C) 452 horas de cultivo. 68

Figura 38 - Resultados obtidos no Experimento 6 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 8 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas durante o cultivo em biorreator de fibra oca foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4. 13. O pH foi determinado com eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. 70

Figura 39 - Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 6. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL. 70

Figura 40 – Comparação entre número de células estimados pelo consumo de glicose em escala logarítmica e quantidade de nutrientes e metabólitos do experimento 6. A curva de crescimento exponencial foi calculada com base nos números estimados de células até 168 horas de cultivo. Pode-se observar que no momento que a arginina atinge valores baixos no meio (indicado pela reta vertical em $t = 168$ horas), o crescimento estimado começa a se afastar da curva exponencial, indicando que na realidade o cultivo entrou em um breve fase estacionária e logo em seguida entrou na fase de morte celular, como é indicado pela seta

verde pontilhada, até atingir o valor final de células retiradas do biorreator, que foi obtido pela metodologia do MTT.	72
Figura 41 - Fotos dos microcarregadores com células ativas expressando GFP do experimento 6. (A) 8 horas de cultivo. (B) 240 horas de cultivo.	72
Figura 42 - Resultados obtidos no Experimento 7 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 8 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher S. Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37° C. O número de células aderidas foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4.13. O pH foi determinado com eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca.	73
Figura 43 - Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 7. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MEM	<i>Alpha minimum essential medium</i> – Meio essencial mínimo alfa
μ	Velocidade específica de crescimento
μm	Micrômetros
BHK	<i>baby hamster kidney</i> – rim de hamster bebê
BPF	Boas práticas de fabricação
C. C	Condição de contorno
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> – ovário de hamster chinês
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetros
C_x	Concentração celular
C_O	Concentração de oxigênio
C_{OL}	Concentração de oxigênio no meio circulante
$C_{O\text{sat}}$	Concentração de oxigênio no meio saturado de ar
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEAE	Dietilaminoetil
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
D_0	Difusividade efetiva de oxigênio
EEC	Espaço extracapilar
FUNDHERP	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
g	Gramas
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> – proteína fluorescente verde
h	Hora
K_0	Contante de Monod de consumo de oxigênio
L	Distância do ponto central entre fibras até uma parede da fibra
LATECC	Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celulares
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Salina tampão de fosfato
PET	Politereftalato de etileno
Rpm	Rotações por minuto
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> – rim canino Madin-Darby

mm	Milímetros
MSC	<i>Mesenchymal stromal cells</i> – Células estromais mesenquimais
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetros
n_{s0}	Quantidade em moles do nutriente no início do processo de crescimento
n_{st}	Quantidade em mols do nutriente depois de um tempo t de crescimento
N_t	Quantidade de células depois de um tempo t de crescimento
N_{t_1}	Quantidade de células no tempo 1
N_{t_2}	Quantidade de células no tempo 2
N_0	Quantidade de células no início do processo de crescimento
q_{o_2}	Taxa de consumo celular de oxigênio
t_1	Tempo 1
t_2	Tempo 2
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i> – transcriptase reversa da telomerase
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
V_{max}	Taxa máxima de consumo de O_2 pela respiração celular
$Y_{x/s}$	Fator de rendimento celular em nutrientes
z	Distância em relação ao ponto central entre duas fibras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3. 1 Célula estromal mesenquimal.....	23
3. 2 Microcarregadores.....	27
3. 3 Biorreatores.....	29
3. 4 Expansão de células estromais mesenquimais em biorreatores	36
3. 5 Comentários sobre a revisão bibliográfica	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4. 1 Célula estromal mesenquimal.....	44
4. 2 Meio de cultura	44
4. 3 Microcarregadores.....	45
4. 4 Biorreator de fibra oca	45
4. 5 Preservação de células.....	48
4. 6 Pré-cultivo	48
4. 7 Fase de adesão.....	49
4. 8 Cultivo em biorreator de fibra oca.....	49
4. 9 Cultivos realizados.....	51
4. 10 Análise de densidade e viabilidade celular	52
4. 11 Determinação da concentração de células viáveis pelo método baseado no MTT... 	53
4. 12 Análise de glicose, lactato, aminoácidos e amônia	53
4. 13 Estimativa do número de células no biorreator de fibra oca.....	54
4. 14 Simulação do perfil de concentração de oxigênio no espaço extracapilar	55
4. 15 Velocidade específica de crescimento	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5. 1 Perfis de oxigênio no espaço extracapilar.....	59
5. 2 Determinação de valores de $Y_{x/s}$ em placa de poços – Experimento 1.....	61
5. 3 Cultivos em frasco spinner.....	64
5. 4 Cultivos no biorreator de fibra oca	65
5. 4. 1 Experimento 4 e 5	65
5. 4. 2 Experimento 6 e 7	69

5. 5	Resumo dos dados obtidos	74
6	CONCLUSÕES.....	77
7	REFERÊNCIAS	78
8	APÊNDICES	87
8.1 A	- Perspectivas futuras.....	87
8. 2 B	– Tabelas de resultados	89

1 INTRODUÇÃO

Terapia celular é o procedimento médico que visa restabelecer a estrutura e a função de um tecido por meio da utilização de células individuais ou de um grupo de populações celulares. Essa atividade está envolvida no tratamento de disfunções orgânicas causadas por trauma, doenças, processos degenerativos precoces naturais ou causados por agressão ambiental, ou pelo processo degenerativo próprio da senilidade. Neste cenário as células-tronco, células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação, entram como importantes ferramentas para auxiliar o reparo e regeneração de vários tecidos usando células do próprio paciente ou doador. Este processo regenerativo tem como princípio a atividade multipotente das células-tronco, ou seja, a sua capacidade como células progenitoras de se diferenciarem *in situ* no tipo celular do sítio receptor (SILVA-JR; BOROJEVIC, 2008).

Dentre as células-tronco, uma fonte promissora de células para a terapia celular é a célula estromal mesenquimal (MSC – *Mesenchymal Stromal Cell*), estas são células dependentes de ancoramento, tendo alta capacidade de aderir em superfícies, sendo de fácil isolamento e de rápida expansão *ex vivo* (DAI *et al.*, 2011). MSCs são clinicamente excelentes agentes terapêuticos para o tratamento de numerosas condições clínicas, como a doença do hospedeiro contra o enxerto, infarto do miocárdio, insuficiência renal, doença de Crohn, reparo da cartilagem e menisco, acidente vascular cerebral e lesão da medula espinhal (CAPLAN, 2007). Entretanto, a baixa frequência de MSCs no indivíduo adulto torna a sua expansão um pré-requisito para terapia celular (RINGDEN *et al.*, 2006).

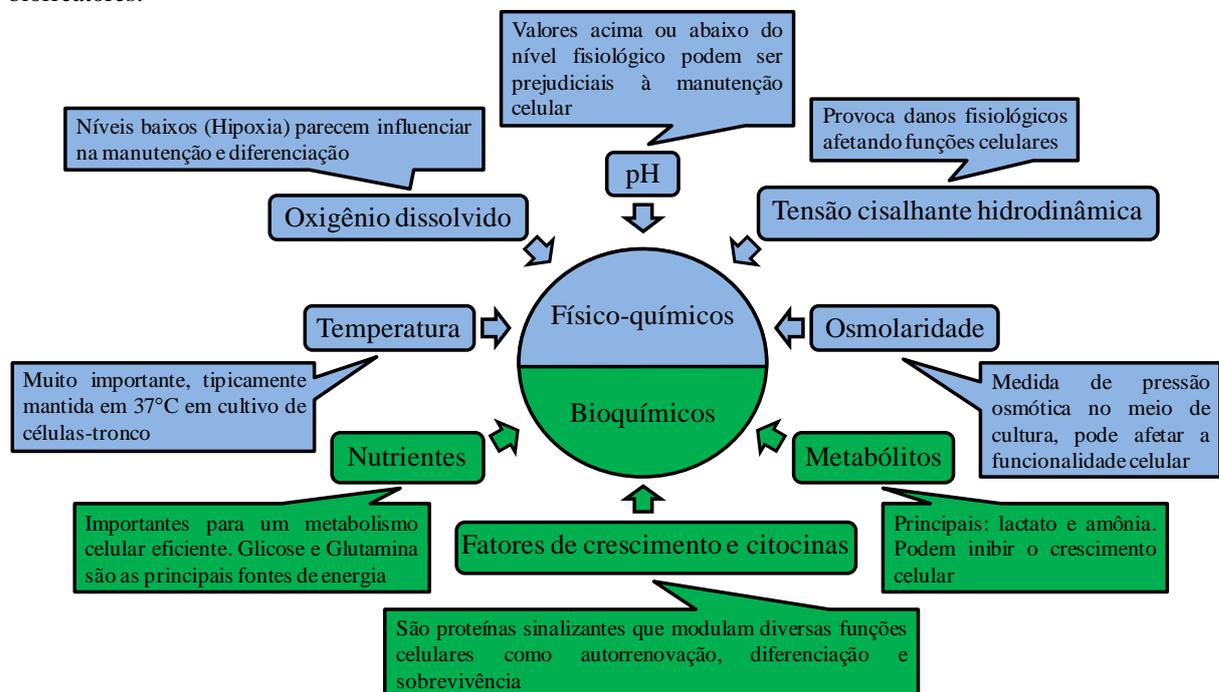
Métodos convencionais de expansão de MSCs em culturas estáticas em frascos comuns de cultura consomem demasiado tempo e necessitam de intensa e crescente mão de obra durante o processo, limitando assim a expansão de células-tronco, sendo que para atingir melhor eficácia terapêutica provavelmente se necessitará de quantidades ainda maiores de células (LAZARUS *et al.*, 2005). Além de limitar o número total de células, tais métodos de cultura forçam as células a suportarem o tratamento enzimático, a dissociação física e a força de centrifugação em seus protocolos de passagens para expansão, sendo necessária a abertura do recipiente de cultura, promovendo prováveis riscos de contaminação (YE *et al.*, 2010).

Métodos de cultura estática também apresentam limites devido ao fato de apresentarem condições heterogêneas de concentração de nutrientes, em razão da transferência de nutrientes ocorrer somente por difusão através do líquido. Sistemas de

biorreatores mais avançados que impõem condições de cultura dinâmicas, como o frasco de suspensão agitada, podem ser a solução para minimizar as limitações do transporte de nutrientes e são cruciais quando uma grande quantidade de células é desejada. Agitação e perfusão são estratégias que podem ser usadas para este objetivo, resultando em diferentes configurações de biorreatores, que podem ser usados na cultura de células-tronco (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008a).

Apesar do notável interesse no desenvolvimento de tecnologias de cultivo de células-tronco, não há muitos relatos na literatura sobre técnicas e equipamentos para sua expansão *in vitro* em larga escala. Para a implementação bem sucedida de cultura de MSCs em sistemas de biorreatores é necessário atender diversos parâmetros críticos, que incluem variáveis físico-químicas, como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e tensão cisalhante. Também deve-se atender parâmetros bioquímicos, incluindo concentrações de nutrientes chave, metabólitos ou fatores de crescimento (RODRIGUES *et al.*, 2011). A Figura 1 resume esse conjunto de parâmetros.

Figura 1 - Parâmetros de processos críticos influenciando a expansão e/ou diferenciação de células-tronco em biorreatores.



(adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2011).

Nos últimos 5 anos, vários tipos de biorreatores foram propostos para a expansão de MSCs, tendo-se destacado biorreatores agitados para células aderidas a microcarregadores (EIBES *et al.*, 2010; FERRARI *et al.*, 2012). Apesar dos grandes

progressos mostrados por esses sistemas de expansão, a formação de aglomerados de microcarregadores devido às ligações célula-célula auxiliadas pela formação de matriz extracelular e as colisões entre partículas no sistema agitado têm limitado o uso dessas técnicas de cultivo. A aglomeração de microcarregadores pode formar partículas na ordem de 1 mm de diâmetro, acabando por limitar o transporte de nutrientes para as células localizadas nas camadas mais afastadas da superfície. Como consequência desse problema, há muita morte celular intraparticular e um aumento na dificuldade na recuperação das células no final do cultivo, inviabilizando sua utilização em aplicações terapêuticas. Essas dificuldades também foram constatadas em trabalhos realizados em biorreatores do tipo tanque agitado pelo grupo do mesmo laboratório onde foi realizada esta dissertação, o Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (SANCHES, 2010; MENDONÇA, 2013).

Um sistema alternativo e pouco estudado na expansão de MSCs é o biorreator de fibra oca (*hollow fiber*). Módulos de fibra oca tiveram muitas aplicações industriais, como filtração, extração e oxigenação em inúmeros processos nas últimas duas décadas. Como biorreatores, eles foram amplamente usados para reações enzimáticas e cultura de células animais, bactérias e leveduras para a produção de anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes e outros bioquímicos de alto valor (CADWELL, 2004). O princípio de uso consiste basicamente em tubos capilares porosos (fibras ocas) paralelos contidos em um cilindro externo. Entre o cilindro e as fibras existe o chamado espaço extracapilar (EEC), onde normalmente as células são inoculadas. No interior das fibras (espaço intracapilar) meio de cultura com nutrientes flui, sendo que os nutrientes difundem-se através dos poros das fibras para o EEC, possibilitando a nutrição das células ali retidas. Além disso, os dejetos metabólicos produzidos pelas células podem permear de volta para dentro das fibras e serem levados pelo fluxo. Biorreatores de fibra oca são considerados uma boa opção para a expansão de células-tronco devido ao seu relativo ambiente homogêneo de cultura, baixa tensão de cisalhamento nas células e controle através de manipulação operacional externa à cultura. Mesmo apresentando bastante potencial no cultivo de células-tronco, existem poucos relatos na literatura do uso do biorreator de fibra oca no cultivo de MSCs (YE *et al.*, 2010).

Observada a importância do desenvolvimento de técnicas de expansão *in vitro* de MSCs para o sucesso da terapia celular, combinada com as qualidades conhecidas e bem estudadas do biorreator de fibra oca, o presente estudo propôs o uso de uma metodologia de

cultivo *in vitro* de MSCs no biorreator de fibra oca, otimizando essa expansão através da utilização de um protótipo de biorreator projetado com auxílio de um modelo matemático e construído especialmente para tal aplicação, a concepção inicial deste protótipo foi realizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares do Departamento de engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos e já foi relatado em trabalhos anteriores (MIZUKAMI, 2012). Os trabalhos realizados pelo grupo com MSCs fazem parte do projeto realizado em conjunto com a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP).

2 OBJETIVOS

Desenvolvimento de uma metodologia de cultivo *in vitro* de MSCs em biorreator de fibra oca, tendo como objetivos:

1 - Avaliação do desempenho de um biorreator de fibra oca com células aderidas ao microcarregador Cultispher[®]-S, inoculadas no espaço extracapilar retidas em um gel e com circulação do meio de cultura pelo espaço intracapilar para expansão de MSCs de forma que:

- a) Se preservem as características de diferenciação multipotente das células;
- b) Não se formem agregados de microcarregadores colonizados com células;
- c) Permita um alto índice de recuperação de células viáveis para uso terapêutico

2 - Obtenção de valores de variáveis importantes do processo (inoculação, composição do meio de cultura e oxigenação) para definição de um protocolo eficiente e reprodutível de expansão e recuperação de MSCs.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão foi dividida em cinco partes principais. Na primeira são apresentados os tipos existentes de células-tronco e focando na MSCs é descrita a sua localização no corpo humano, técnicas de isolamento, características da sua expansão, meio de cultura e aditivos usados. Na segunda parte é descrito o cultivo em microcarregadores, mostrando o histórico de sua criação, importância atual e características comuns encontradas. Na terceira parte são apresentados diferentes tipos de biorreatores candidatos a serem utilizados na expansão de MSCs. Na quarta parte são apresentados os estudos realizados na expansão de MSCs em biorreatores para mostrar como está o cenário atual das pesquisas com esse tipo celular. Na quinta parte são feitas considerações sobre esta revisão.

3.1 Célula estromal mesenquimal

Uma cadeia ordenada de processos altamente regulados de proliferação, migração, diferenciação e maturação celular resultam na produção e manutenção da maioria das linhagens celulares em organismos adultos. As primeiras células desta cadeia são chamadas de células-tronco. Junto com a sua capacidade extensiva de autorrenovação, as células-tronco demonstram um amplo potencial para dar origem a diversas progênes diferenciadas. Além das células-tronco hematopoiéticas e intestinais, consideradas por muitos anos como paradigmas de células-troncos, organismos adultos contêm diversas outras classes de células-tronco (MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001).

Quando descritas por sua habilidade de se diferenciar em diferentes tipos de tecidos, células-tronco são classificadas como totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente ou unipotente. Células-tronco totipotentes têm a habilidade de dar origem a um organismo completo. Células-tronco pluripotentes têm uma capacidade menor de diferenciação, podendo formar a maioria de tipos de células e gerar alguns ou todos os tecidos extraembrionários. Células-tronco multipotentes têm capacidade de formar múltiplas linhagens que constituem um ou mais tecidos completos. Células-tronco com capacidade de formar duas ou mais linhagens dentro de um tecido são descritas como oligopotentes, e

aquelas que podem formar uma única linhagem são descritas como unipotentes (SMITH, 2006).

Células-tronco humanas, quando categorizadas por origem, são geralmente descritas como embrionária, fetal, umbilical ou adulta. Células pluripotentes derivadas do embrião são encontradas na massa celular interior do quinto ao sexto dia de vida do blastocisto (DONOVAN; GEARHART, 2001). Células-tronco fetais são multipotentes, sendo elas encontradas em vários tecidos dos fetos, incluindo sangue, fígado, medula óssea, pulmão, rim e pâncreas (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001). Células-tronco umbilicais são multipotentes (ROGERS; CASPER, 2004) e são geralmente isoladas do cordão umbilical (BIEBACK *et al.*, 2004) ou do tecido conjuntivo que cobre os vasos sanguíneos dentro do cordão umbilical (WANG *et al.*, 2004). Células-tronco adultas são divididas em germinativas e somáticas. As células-tronco germinativas são unipotentes e somente dão origem a oócitos na fêmea e espermatozoides no macho, as quais são ambas células-tronco totipotentes. Células-tronco somáticas são multipotentes, tendo a capacidade de diferenciação limitada, e de desenvolver múltiplas linhagens que formam um tecido em particular (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008b).

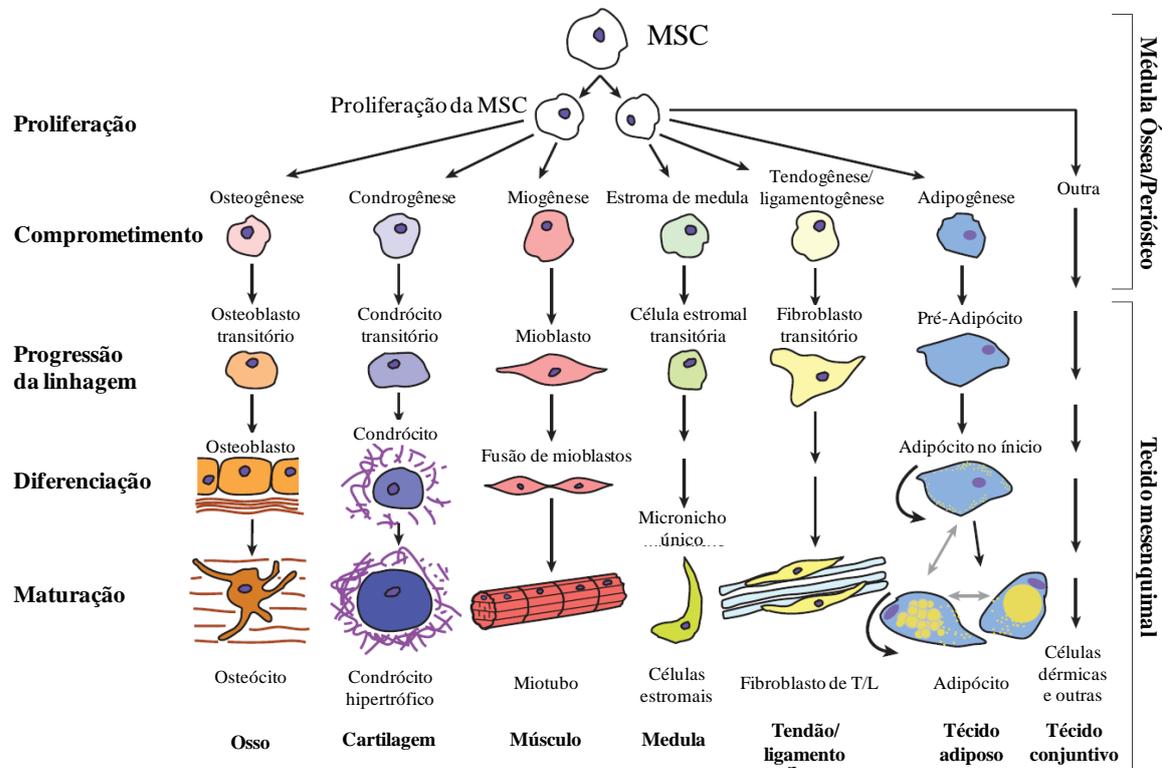
Dentre as células-tronco adultas somáticas estão as células estromais mesenquimais (MSCs), que são células multipotentes capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos e outros tecidos de origem mesenquimal (Figura 2). No corpo humano elas podem ser consideradas como reservatórios prontamente disponíveis de células reparativas capazes de se mobilizar, proliferar e diferenciar para o tipo celular apropriado em resposta à certos sinais (POUNTOS *et al.*, 2007).

Mesmo tendo sido inicialmente isoladas da medula óssea de mamíferos, as MSCs foram encontradas em um grande número de tecidos adultos, incluindo periósteo, osso trabecular (osso de estrutura esponjosa), tecido adiposo, membrana sinovial, músculo esquelético, dentes temporários infantis (BARRY; MURPHY, 2004), cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, timo, pâncreas (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006), derme (YOUNG *et al.*, 2001) sangue (ZVAIFLER *et al.*, 2000) tendão e ligamento (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008b).

Não existe um protocolo estabelecido para o isolamento de MSCs, mas existe um grande número de protocolos provendo dados não comparáveis. O primeiro e mais simples método usado implica nas propriedades aderentes das MSCs, onde a medula óssea inteira era colocada em placas de cultura plásticas e depois de 4 horas as células não aderentes

eram descartadas. Foi observado que as células permaneciam dormentes por 2 a 4 dias e depois proliferavam rapidamente (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970).

Figura 2 – Processo Mesengênico.



(SINGER; CAPLAN, 2011).

O próximo passo após o isolamento é a expansão em número de células *ex-vivo* das MSCs. Este estágio permite a autorreplicação livre das MSCs objetivando um número suficiente para o uso clínico. Diversos fatores podem influenciar o rendimento da expansão de MSCs e esses fatores são dependentes de doadores ou dependentes da técnica. Fatores dependentes de doadores incluem idade (STENDERUP *et al.*, 2003), presença de traumas (SEEBACH *et al.*, 2007) e a presença de doenças sistêmicas (PENG *et al.*, 2007). Por exemplo, MSCs de pacientes que sofrem de Hepatite B têm uma menor curva de crescimento mesmo que apresentem a mesma aparência, forma e marcadores de superfície (PENG *et al.*, 2007). Os fatores dependentes da técnica são na maioria relacionados ao número alvo de células e a qualidade do ambiente proporcionado para as células, sendo eles o número de passagens de MSCs, o método de cultura (tipo de biorreator) e o meio que será usado para expansão (POUNTOS *et al.*, 2007).

As MSCs podem se dividir por cerca de dezenove a vinte vezes sem perder totalmente a sua propriedade de se proliferar e diferenciar (MURAGLIA; CANCEDDA;

QUARTO, 2000). Entretanto, sabe-se que o potencial de diferenciação da célula é gradualmente reduzido durante a expansão e o subcultivo extensivo compromete as funções celulares resultando numa senescência celular que é associada com a interrupção do crescimento e a apoptose. Sendo assim a duração e a condição de cultura podem ser cruciais para o sucesso do uso clínico destas células e devem ser consideradas ao desenvolver uma estratégia terapêutica (BANFI *et al.*, 2000).

Um dos mais importantes componentes de uma expansão satisfatória de MSCs é o meio de cultura usado (POUNTOS *et al.*, 2007). Um meio de cultura consiste em uma solução que contém quantidades mínimas de aminoácidos, vitaminas, glicose, sais e proteínas do soro necessárias para a proliferação celular (EAGLE, 1955). Tanto quanto a composição basal do meio e do soro usados podem resultar em uma diferença significativa no rendimento da expansão de MSCs. Em um estudo foram comparados 8 meios basais diferentes em termos de índice de crescimento e número final de células obtidas em cultura. Os resultados mostraram grande diferença entre os meios basais, sendo o meio α -MEM (*alpha Minimum Essential Medium*) com Glutamax (substituto para glutamina de origem não animal, Life Technologies, EUA) com 10% de soro bovino fetal o que apresentou melhores resultados (SOTIROPOULOU *et al.*, 2006).

É comum a dependência da adição de soro fetal bovino ao meio de cultura, porém, o soro é uma fonte indesejável de antígenos xenogênicos, tendo o potencial de transmitir vírus animais e príons e ter problemas com variabilidade entre diferentes lotes. Os órgãos reguladores mais exigentes podem exigir que o meio siga normas parecidas com as da indústria farmacêutica, ou seja, composto de proteínas purificadas e bem caracterizadas. Outra vantagem de um meio específico definido seria a melhoria da reprodutibilidade do processo de expansão de MSCs, sem a necessidade de testar lotes de soros individualmente. Soro autólogo humano pode ser uma alternativa viável para o meio suplementado de soro, minimizando o risco de transmissão de doenças (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008a). Foi desenvolvido um sistema fechado para obtenção de soro autólogo, obtendo superior expansão de MSCs em comparação ao meio suplementado com soro fetal bovino (MIZUNO *et al.*, 2006). Similarmente o lisado plaquetário obtido de concentrados de trombócitos humanos aumentou o crescimento de MSCs, sendo este lisado proposto como um substituto ao soro fetal bovino aplicável ao uso clínico (LANGE *et al.*, 2007). É importante lembrar que o suprimento limitado e o custo de produtos sanguíneos compatíveis e seguros para o uso terapêutico são importantes considerações para o aumento de escala.

Por ser uma célula aderente, toda metodologia de expansão de MSCs deve possuir uma superfície de adesão celular, podendo ela ser própria do biorreator, como por exemplo o fundo tratado para adesão dos frascos plásticos de cultivos, ou adicionada através de um componente adicional no cultivo, como por exemplo os microcarregadores.

3. 2 Microcarregadores

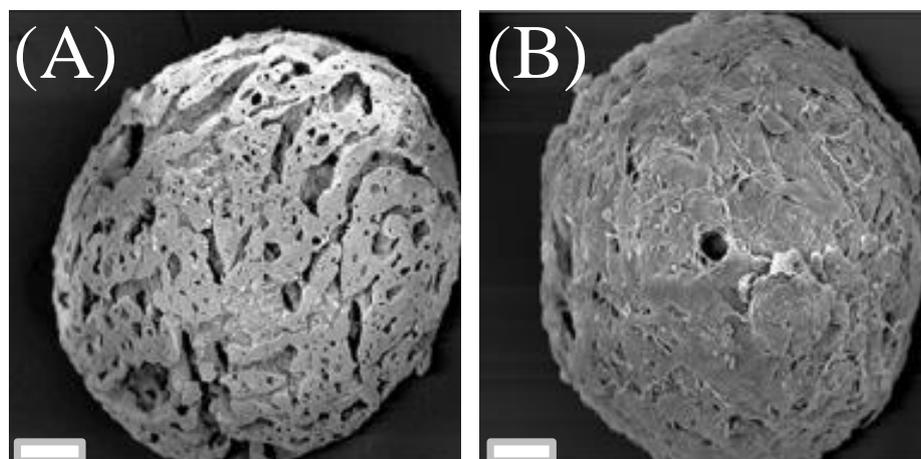
A maioria dos produtos de cultura celular de mamíferos derivados de DNA recombinante é produzida usando células crescendo em suspensão. Células mais comumente usadas incluem células do ovário de hamster chinês (CHO), do rim de hamster neonato (BHK), de hibridoma e mieloma. Estas células podem ser cultivadas em fermentadores similarmente a microrganismos. Entretanto, a grande maioria de células cultivadas em laboratórios de pesquisa e muitas usadas na produção de vacinas virais para humanos ou para uso veterinário é dependente de ancoramento ou prefere o ancoramento. Isto significa que elas precisam se ligar a uma superfície compatível para sobreviver e multiplicar ou se uma superfície compatível estiver disponível elas vão se ligar prontamente ao invés de continuar em suspensão. Células dependentes de ancoramento frequentemente usadas incluem células de rim canino Madin-Darby (MDCK), Vero, fibroblastos como a linhagem MRC-5 e WI-38 e quase todas as células primárias diferenciadas de tecidos não sanguíneos, como hepatócitos, células neuronais e condrócitos (PESHTWA; WONG; HU, 1999).

A necessidade de estabelecer um método de cultivo de células dependentes de ancoramento em larga escala promoveu o desenvolvimento de microcarregadores. Estes são basicamente pequenas esferas com diâmetro em escala de micrômetros que são compostos por materiais compatíveis para a adesão celular assim permitindo o crescimento de células dependentes de ancoramento. O primeiro cultivo em microcarregadores foi demonstrado por van Wezel com partículas de dietilaminoetil (DEAE) Sephadex A50 originalmente desenvolvidas para empacotamento de colunas para cromatografia de troca iônica (VAN WEZEL, 1967). O primeiro produto de escala industrial (vacina de polio inativada) produzido em cultivo em microcarregadores foi subsequentemente introduzido por van Wezel (VAN WEZEL, 1972). Este novo método de cultivo de células dependentes de ancoramento estimulou outros pesquisadores a descobrirem novas técnicas para melhorar a adesão celular

nas esferas, testar novos tipos de microcarregadores e aumentar a densidade celular. Desde então uma variedade de microcarregadores foi desenvolvida e muitas pesquisas possibilitaram uma compreensão da melhora das condições de cultivo. Com o uso de microcarregadores para adesão celular, uma grande superfície de crescimento pôde ser contida em um dado volume de reator com um ambiente relativamente homogêneo. Com o uso de um reator similar aos fermentadores convencionais, monitoramento e controle ambiental se tornou possível, assim abrindo a possibilidade de um melhoramento do processo (PESHWA; WONG; HU, 1999).

A maioria dos microcarregadores convencionais tem um diâmetro de aproximadamente 200-250 μm quando suspenso no meio e uma densidade específica de 1,02 – 1,03 g/cm^3 , um pouco maior que o do meio (próximo de 1 g/cm^3). Esta densidade um pouco maior permite que seja necessário um baixo nível de agitação para manter os microcarregadores em suspensão. Ela também permite a sedimentação após o desligamento da agitação, o que é ideal para a coleta de células ou troca de meio para permitir um maior crescimento. Uma cultura típica usa uma concentração de microcarregadores equivalente ao volume de esferas sedimentadas de 5 a 15% do volume total de cultura. Isto fornece uma área superficial de 0,5 a 1,5 m^2/L de volume de cultura. O potencial de aumentar a superfície de crescimento foi avançado com o desenvolvimento de microcarregadores macroporosos, que são esferas convolutas altamente porosas com cavidades internas para a adesão e crescimento celular (NILSSON; BUZSAKY; MOSBACH, 1986). Um exemplo deste tipo de microcarregador macroporoso é o Cultispher-S (Percell Biolytica AB, SWE) (Figura 3).

Figura 3 - Microcarregador Cultispher-S sem células (A), com células estromais de ratos (B) Barra de escala = 40 μm .



(YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007).

Processos com microcarregadores, devido à sua facilidade de operação e

controle, são ideais para o cultivo de células dependentes de ancoramento tanto em laboratório quanto em larga escala. As necessidades da operação do biorreator são virtualmente idênticas àquelas de uma típica cultura de células suspensas em fermentadores. O limite máximo de agitação, entretanto, é menor, devido ao fato de promover um maior número de colisões entre microcarregadores e de que se faz necessário um período inicial de baixa agitação ou agitação intermitente para promover a adesão celular. É importante nesta fase uma distribuição homogênea de células por microcarregadores, evitando assim a presença de microcarregadores livres de células, fato que prejudica o rendimento do crescimento celular (PESHTWA; WONG; HU, 1999).

3.3 Biorreatores

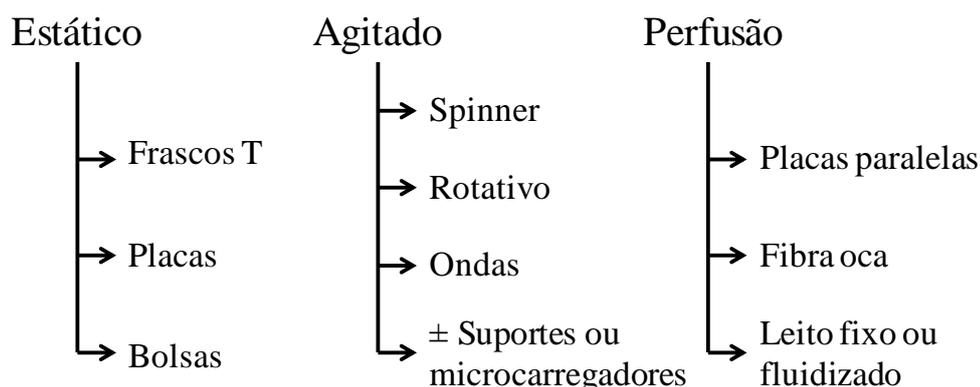
Um biorreator é definido como um equipamento capaz de fornecer os requisitos fisiológicos da célula, ou seja, para uma implementação bem sucedida de cultura de células-tronco, diversos requisitos devem ser satisfeitos. Isso inclui variáveis físico-químicas, como pH, oxigênio dissolvido ou temperatura, e bioquímicos, incluindo os níveis de nutrientes, de metabólitos ou de fatores de crescimento (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Os biorreatores mais simples são os aparelhos de cultura estática (frascos, bolsas ou placas) consistindo em um único compartimento sem agitação onde nutrientes se difundem para as células. A troca de gases (oxigênio e dióxido de carbono) ocorre na interface gás/meio. A agitação irá reduzir a camada limite estagnada em volta das células, suportes ou microcarregadores, além de criar um microambiente celular mais homogêneo, estes reservatórios agitados podem ser alimentados em batelada (uma única vez), em batelada alimentada (entrada contínua sem saída) ou se as células estiverem imobilizadas em suportes ou microcarregadores, usando um sistema de perfusão contínuo. Um sistema de perfusão tenta substituir a função da microcirculação para que as células cresçam perto da densidade tecidual (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008a). Exemplos deste tipo de classificação de biorreatores e exemplos típicos de cultivo de células animais se encontram na Figura 4.

A escolha usual para a cultura de células de mamíferos e também de células-tronco, em escala laboratorial são superfícies planas de duas dimensões como frascos de cultura de tecidos (frascos-T), placas de poços ou bolsas de sangue permeáveis à gás.

Entretanto, apesar de sua simplicidade, fácil manipulação e baixo custo, esses sistemas estáticos de cultura apresentam sérias limitações. Primeiro, a troca de gases ocorre somente na interface gás/meio e a natureza estática da cultura conduz à criação de gradientes de concentração (pH, oxigênio dissolvido, nutrientes, metabólitos, etc.) no meio de cultura. O aumento de escala desses sistemas de cultura também é difícil. Quando um número alto de células é necessário, a razão área superficial/volume baixa como a encontrada em frascos-T implica na necessidade de uso de múltiplos recipientes de cultura ou frascos com múltiplas bandejas, com o subsequente aumento na ocupação de incubadora, tempo de manuseio (para a alimentação, monitoramento das células e a coleta das células), risco de contaminação e também no aumento do custo (RODRIGUES *et al.*, 2011). A automatização do processo de cultura de células-tronco hematopoiéticas foi proposta, minimizando alguns dos impactos citados, porém a cultura ainda ocorreria em condições estáticas (THOMAS *et al.*, 2009).

Figura 4 - Classificação de biorreatores e exemplos destes.



(GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008a).

Para superar as limitações no transporte de nutrientes de culturas estáticas e assim alcançar concentrações celulares maiores, são usados biorreatores que podem acomodar culturas dinâmicas. Primariamente, perfusão e agitação têm sido usadas como meios para aumentar o transporte de nutrientes (PLACZEK *et al.*, 2009).

Amplamente usados e caracterizados para a cultura das células microbianas e animais, na maior parte para a produção de proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais, os biorreatores de tanque agitado (spinners) são bastante atrativos para a produção em larga escala de células-tronco. Suas principais qualidades são: design simples; possibilidade de aumento de escala; e a possibilidade de monitoramento e controle online. Frascos spinner são recipientes de vidro ou plástico com um eixo agitador magnético central e braços laterais para a adição e retirada de células e meio (Figura 5). Em spinners

convencionais, concentrações de 10^6 - 10^7 células/mL podem ser obtidas e para aplicações relevantes clínicas (onde de 1×10^9 a 1×10^{10} células-tronco são necessárias) volumes de trabalho de algumas centenas de mililitros até alguns litros podem ser necessários. Em spinners, células podem ser cultivadas como células individuais, como agregados ou, no caso de células dependentes de ancoramento, ligadas em microcarregadores ou outros suportes (KEHOE *et al.*, 2010). Contudo é necessário um cuidadoso planejamento do design dos impelidores para evitar muita tensão cisalhante, que pode prejudicar as células (NIELSEN, 1999).

Figura 5 - Exemplo de um frasco spinner.



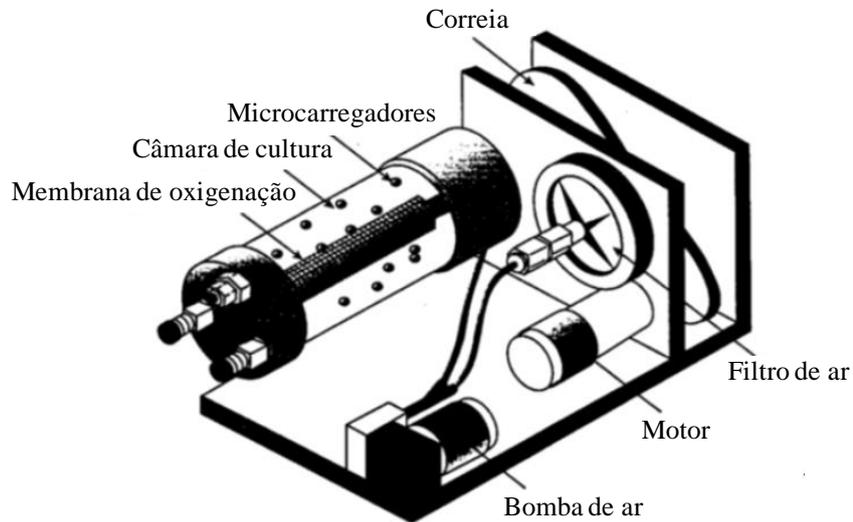
(GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008a).

Tendo em mente a redução do cisalhamento e turbulência na cultura celular, foi desenvolvido o reator de paredes rotativas, onde um cilindro rotativo horizontal que está preenchido com meio de cultura (sem interface gás-líquido) gira o líquido interior na mesma velocidade angular que a parede (Figura 6). Se a velocidade do fluido rotativo for igual e oposta ao nível de sedimentação das células ou microcarregadores, a suspensão de células vai se manter em um estado de queda livre, enquanto que a oxigenação acontece através de uma membrana de silicone localizada no centro do cilindro (GRANET *et al.*, 1998).

Visando cumprir as exigências de segurança das boas práticas de fabricação (BPFs), uma atrativa opção é o biorreator de onda (*wave*), que consiste em uma bolsa descartável, parcialmente preenchida com meio e inoculada com células, com o restante inflado de ar. A bolsa de cultura é colocada em uma plataforma especial, na qual através do movimento de balanço gera ondas na interface ar-líquido (Figura 7) (SINGH, 1999). Devido às bolsas de cultura serem pré-esterilizadas e descartáveis, isto torna este biorreator adequado para o uso clínico. Mesmo sendo o controle dos parâmetros de cultura e o aumento de escala

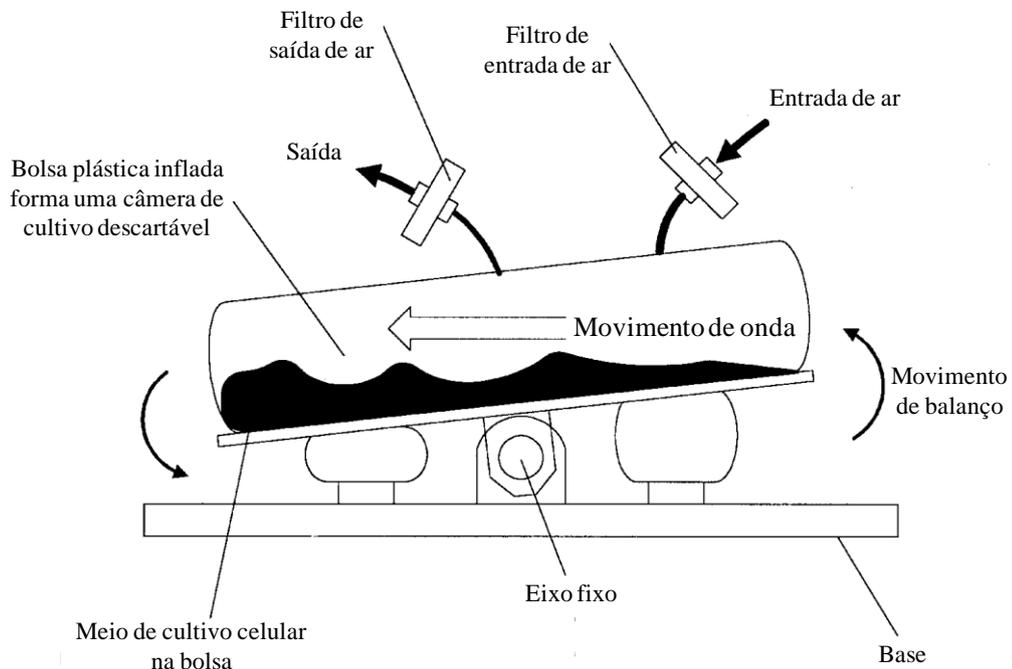
possível, o alto custo das bolsas descartáveis pode limitar o uso deste biorreator em pesquisa (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Figura 6 - Diagrama esquemático de um biorreator de paredes rotativas.



(GRANET *et al.*, 1998).

Figura 7 - Biorreator com agitação induzida por ondas.



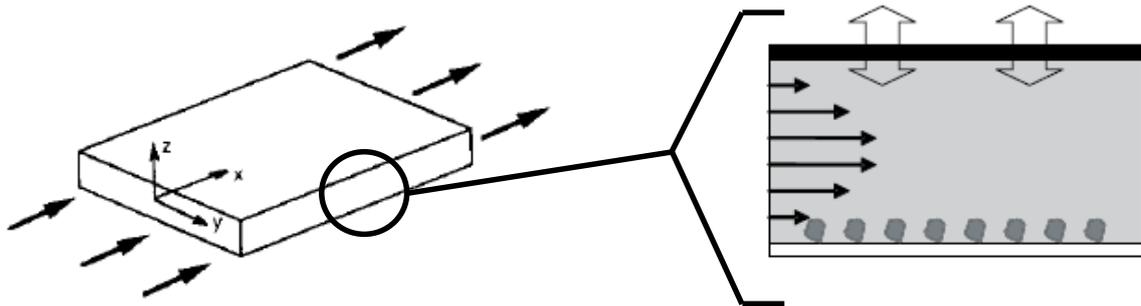
(SINGH, 1999).

Biorreatores podem também operar em perfusão. Nesse caso o transporte de nutrientes é aumentado pela contínua troca de meio, conforme o meio fresco ou reciclado é

introduzido e o meio esgotado é removido, melhorando o crescimento celular pela constante substituição de nutrientes gastos e a remoção de produtos metabólicos inibitórios (KING; MILLER, 2007). Exemplos de biorreatores desenvolvidos baseados nesse conceito são: biorreatores de placa paralela, fibra oca, leito fixo e leito fluidizado.

Biorreatores de placas paralelas consistem em um compartimento de gás superior separado por uma membrana do fundo cheio de líquido, o qual tem uma superfície de plástico de cultivo de tecido para a aderência de células dependentes de ancoramento (Figura 8) (PENG; PALSON, 1996). Esses reatores têm a vantagem de automação simples, possibilitando a alimentação de cultura contínua e automatizada, mas apresenta dificuldades na coleta de amostras representativas do sistema, sendo simples somente a coleta total (NIELSEN, 1999).

Figura 8 - Esquema representativo de um biorreator de placas paralelas.



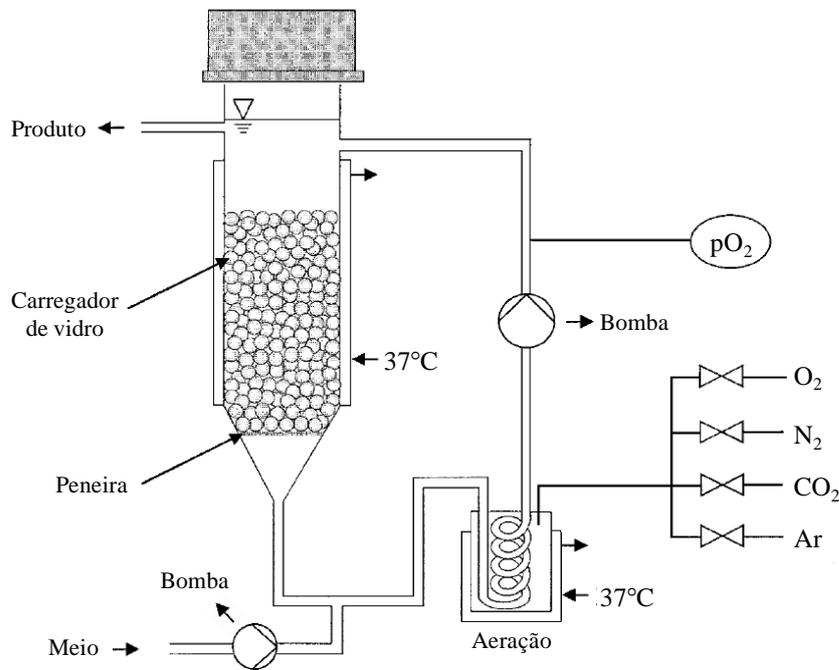
(adaptado de PENG;PALSON, 1996; GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008a).

Biorreatores de leito fixo e fluidizado consistem em um suporte imobilizado disposto em uma coluna, o leito do biorreator, onde as células são inoculadas. A coluna pode consistir em partículas, empacotadas (leito fixo) ou flutuantes (leito fluidizado). Embora esses reatores possibilitem um suporte tridimensional para a aderência e o crescimento celular, melhor imitando as condições *in vivo*, podem ocorrer gradientes de concentrações espaciais (em reatores de leito empacotado) e efeitos de tensão cisalhante (leito fluidizado) (RODRIGUES *et al.*, 2011). Um diagrama esquemático de um biorreator de leito fixo utilizado para a expansão de células progenitoras hematopoiéticas humanas é apresentado na Figura 9.

Módulos de membrana de fibra oca (*hollow fiber*) tiveram várias aplicações, como filtração, extração e oxigenação em inúmeros processos industriais por muitos anos. Como biorreatores, eles são usados consideravelmente para reações enzimáticas e cultura de células de animais, bactérias e leveduras. As fibras ocas são contidas em uma carcaça externa

(normalmente no formato cilíndrico). As células podem ser aderidas na superfície externa das fibras ou mais usualmente no espaço extracapilar (EEC) (YE *et al.*, 2010).

Figura 9 - Diagrama esquemático de um sistema do biorreator de leito fixo.



(MEISSNER *et al.*, 1999).

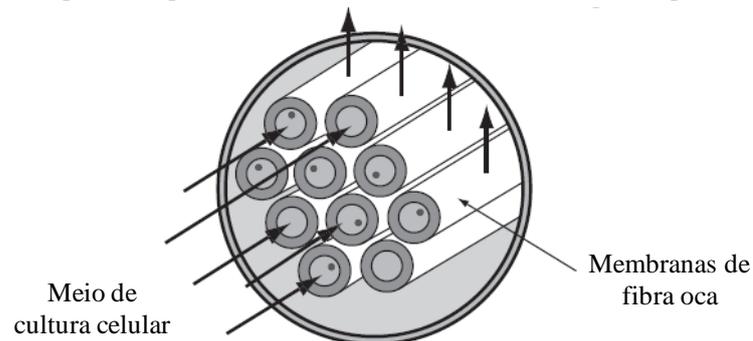
Nutrientes fluem no interior das fibras e podem difundir para fora através dos poros da parede da própria fibra para alimentar as células (Figura 10). Igualmente, os resíduos metabólicos produzidos pela célula podem permear para o interior das fibras e serem removidos pelo fluxo de meio. O sistema de biorreatores de fibra oca tem sido usado para cultivar uma variedade de linhagens de células de mamíferos desde a sua criação por Richard A. Knazek (KNAZEK *et al.*, 1972). Biorreatores de fibra oca para culturas de células de mamíferos são principalmente usados para produzir bioquímicos de alto valor como vacinas (PRILLIMAN *et al.*, 1997), interferons (NACHMAN, 1992), hormônios (HUSSAIN *et al.*, 1996), fatores de crescimento (LIU *et al.*, 1991), vírus (RATNER; CLEARY; JAMES, 1978) e anticorpos monoclonais (YAZAKI *et al.*, 2001) e para agir como órgãos artificiais em organismos vivos (LEGALLAIS; DAVID; DORÉ, 2001; DELAUNAY *et al.*, 1998).

O suprimento contínuo e uniforme de nutrientes líquidos e gasosos e a remoção de resíduos metabólicos proporcionam um microambiente estável para as células. A propriedade de permeabilidade seletiva pode proteger a cultura celular do sistema imune em aplicações de órgãos artificiais e facilitar a recuperação de produtos biológicos fabricados (THARAKAN; GALLAGHER; CHAU, 1988), enquanto que as células são sujeitas a baixas

tensões cisalhantes devido a sua separação do fluxo de nutrientes que ocorre somente no interior da fibra. Mais recentemente, biorreatores de fibra oca encontraram sua aplicação na área da medicina regenerativa (engenharia de tecidos e terapia celular). Aplicações da engenharia de tecido visam o desenvolvimento de tecidos funcionais de células em combinação com uma matriz adequada para dar suporte e acelerar a cura regenerativa, enquanto a terapia celular visa somente transplantar o tipo e a quantidade necessária de células no local de defeito. O conceito de um biorreator de fibra oca para cultivar tecido ósseo é mostrada na Figura 11, a ideia original deriva de como o sangue é fornecido ao osso humano compacto (YE *et al.*, 2010). Um sistema comercial do biorreator de fibra oca usado na produção de produtos bioquímicos é apresentado na Figura 12. Neste sistema existe um alto número de fibras no interior do cartucho para aumentar a área superficial disponível, porém o volume disponível no EEC é reduzido.

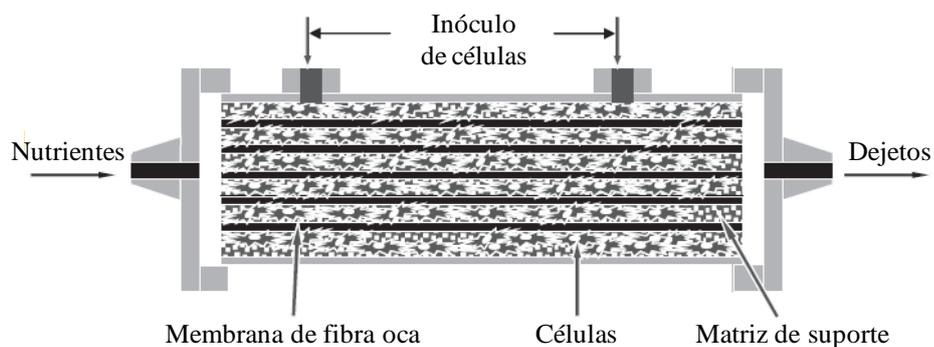
Figura 10 - Esquema de um biorreator de fibra oca.

Meio difunde para fora para alimentar as células no EEC através das paredes das fibras



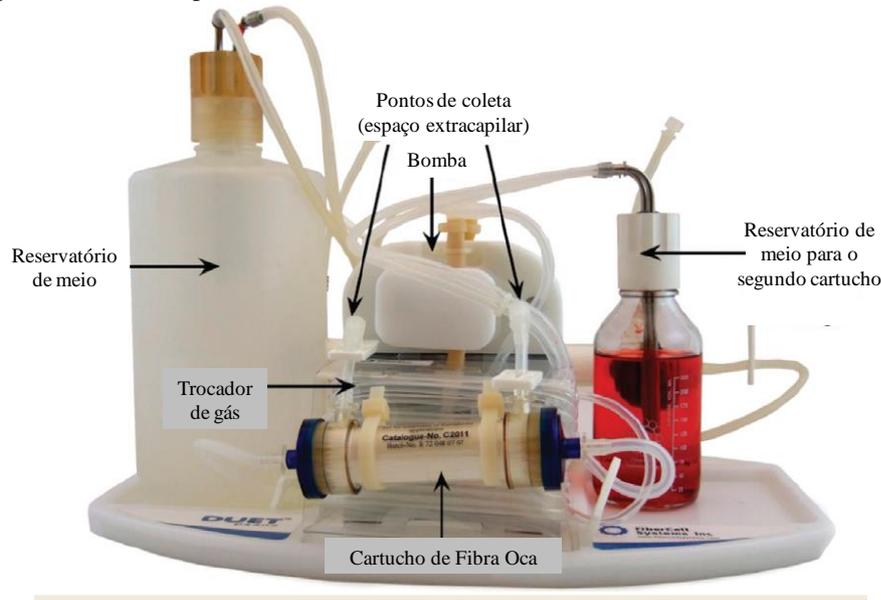
(YE *et al.*, 2010).

Figura 11 - Diagrama esquemático de um biorreator de fibra oca para a engenharia de tecidos. As fibras ocas são embutidas paralelamente uma a outra dentro do material de suporte e a estrutura toda está presa em um invólucro externo. Células são inoculadas fora das fibras ocas e os nutrientes que fluem no interior da fibra podem difundir para fora através das paredes porosas das fibras para alimentar as células. Os resíduos do metabolismo celular podem também permear para o interior da fibra oca e serem removidos.



(YE *et al.*, 2010).

Figura 12 - Típico biorreator de perfusão de fibra oca automatizado (FiberCell®).



(WHITFORD; CADWELL, 2009).

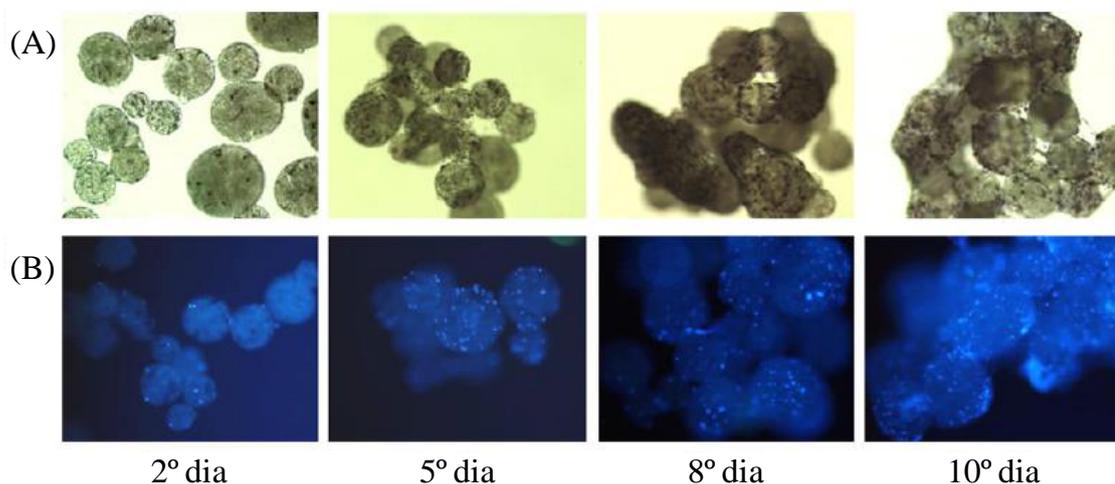
3. 4 Expansão de células estromais mesenquimais em biorreatores

Mesmo as MSCs sendo células dependentes de ancoramento, tipicamente crescendo como uma monocamada em frascos de cultura convencionais, elas foram cultivadas com sucesso como células individuais em um spinner, mantendo a sua habilidade de formar tecido ósseo, entretanto de uma maneira dependente de citocinas (BAKSH; DAVIES; ZANDSTRA, 2003). Em seguida, foram analisadas as interações entre fatores solúveis encontrados em culturas de células mesenquimais e hematopoiéticas, demonstrando a possibilidade de uma estratégia de cultura mútua destas linhagens em um bioprocessamento definido escalonável (BAKSH; DAVIES; ZANDSTRA, 2005).

Na ausência de uma superfície plástica adaptada em um biorreator, a alternativa mais comum é cultivar MSCs aderidas em microcarregadores. Microcarregadores Cytodex® tipo 1, 2 e 3 foram usados para testar a aderência de MSCs suínas e devido aos bons resultados com o Cytodex® 1, foi testado um cultivo de 28 dias, sendo que o crescimento e a manutenção do potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico das células aderidas foram comprovados (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007). Em outro estudo, o crescimento e metabolismo de MSCs caprinas em culturas de frasco spinner com Cytodex® 1 foram

estudadas e o regime de alimentação foi otimizado. Durante o cultivo, concentrações de nutrientes (glicose e glutamina) e metabólitos (lactato e amônia) no meio foram monitoradas permitindo uma correlação entre consumo de nutriente, produção de metabólitos e crescimento celular, sendo que a alimentação de 30% de meio novo com microcarregadores a cada 3 dias resultou nos melhores resultados (SCHOP *et al.*, 2008). MSCs murinas derivadas da medula óssea (YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007) e derivadas da orelha (SART; SCHNEIDER; AGATHOS, 2009) também foram cultivadas com sucesso em microcarregadores gelatinosos com macroporos (Cultispher-S[®]). MSCs derivadas da placenta humana foram expandidas em biorreatores agitados com microcarregadores Cytodex[®] 3 obtendo uma expansão 1,73 vezes maior do que em frascos T e obtendo fenótipo antigênico comparável entre os diferentes sistemas, indicando um fenótipo adequado de MSCs (YU *et al.*, 2009). Um sistema de frasco spinner contendo pouco soro (MesenPRO RS[®]) foi descrito para o cultivo de MSCs humanas em microcarregadores Cultispher-S[®] durante dez dias (Figura 13). Um aumento máximo de 8,4 vezes no número de células foi observado no oitavo dia com manutenção do seu potencial de diferenciação em linhagens adipogênicas e osteogênicas, assim como sua habilidade clonogênica (EIBES *et al.*, 2010).

Figura 13 - Imagens coradas de MTT (A) e DAPI (B) de partículas de Cultispher S durante o tempo de cultivo em frasco spinner.



(EIBES *et al.*, 2010).

Apesar da melhora dos fatores de expansão de MSCs com a utilização de microcarregadores, a formação de aglomerados de microcarregadores nas etapas avançadas do cultivo inviabiliza a continuidade do processo. A Figura 14 mostra a evolução da formação de partículas grandes de aglomerados de microcaregadores que podem atingir tamanhos de 1 mm

aproximadamente. A medida que o número de células aderidas à superfície do microcarregador aumenta, o mesmo acontece com a quantidade de matriz extracelular sintetizada pelas MSCs. A formação de matriz extracelular é um processo natural e necessário para formação de um microambiente propício para as MSCs, porém, dificulta o acesso de nutrientes, principalmente de oxigênio, para as células localizadas nas camadas interiores dos aglomerados. A princípio, qualquer estratégia que vier a ser adotada para evitar a formação de grandes aglomerados deve levar em consideração que a formação de matriz extracelular é extremamente importante para a sobrevivência e função das MSCs. Na ausência da matriz extracelular a célula entra em processo de anoikis (morte celular por falta de ancoramento) (SANTOS *et al.*, 2012).

Os sistemas de cultivos em suspensão agitada favorecem a formação de aglomerados porque os microcarregadores colidem com bastante frequência e a matriz extracelular atua com um material adesivo que acaba por ligar vários microcarregadores entre si formando aglomerados de microcarregadores colonizados com células. Qualquer estratégia de cultivo em suspensão agitada que diminua o número de colisões entre microcarregadores deverá diminuir a aglomeração. Porém, é difícil desenvolver estratégias que evitem a movimentação de partículas num sistema de suspensão agitada, sendo a alteração no nível de rotação já estudada, porém sem a resolução do problema em si (FERRARI *et al.*, 2012).

Células-tronco e progenitoras isoladas das células mononucleadas da medula óssea humana foram expandidas em um sistema de perfusão contínuo de placas paralelas, obtendo diferentes taxas de crescimentos para as diferentes linhagens encontradas (KOLLER; EMERSON; PALSSON, 1993). Uma população mista de células-tronco e progenitoras da medula óssea foi expandida em um biorreator de perfusão de passagem única, sendo a capacidade osteogênica equivalente a de linhagens puras de MSCs (DENNIS *et al.*, 2007). Um novo sistema de perfusão tubular permitiu o cultivo de MSCs em suportes tridimensionais (de alginato) e foi obtida uma diferenciação osteoblástica inicial devido à presença de tensão cisalhante hidrodinâmica, permitindo o estudo do efeito da tensão contínua na diferenciação das MSCs (YEATTS; FISHER, 2011). Também foi descrito um sistema de perfusão, onde células crescem apoiadas em matrizes poliméricas tridimensionais de politereftalato de etileno (PET), mantendo o potencial de diferenciação em linhagens osteoblásticas e adipogênicas depois de extensiva cultura, cuja duração foi de 40 dias, onde as células aumentaram em 20 vezes o seu número inicial (ZHAO; MA, 2005).

A linhagem modelo MSC-TERT (*telomerase reverse transcriptase*), que foi

geneticamente modificada com o gene da subunidade catalítica da telomerase humana, foi usada para demonstrar o uso do biorreator de leito fixo. Este é baseado em esferas de vidro de borosilicato não porosas, para a expansão de MSCs, com inoculação, coleta de células e cultivo automatizados. Volumes de leito de até 300 mL (Figura 14) foram usados e o design simples do reator pode permitir a manufatura de um sistema descartável (WEBER *et al.*, 2010).

Figura 14 - Sistema de biorreator de leito fixo de 300 cm³.



(WEBER *et al.*, 2010).

Células mononucleadas da medula óssea foram também cultivadas em sistemas de biorreator rotativo e após oito dias de cultura o número de MSCs aumentou 29 vezes, células-tronco hematopoiéticas aumentaram 8 vezes e o total de células aumentou 9 vezes. As MSCs expandidas no biorreator expressaram marcadores de células mesenquimais primitivas e foram capazes de se diferenciar em condrócitos, osteoblastos e adipócitos em protocolos de indução apropriados. O problema encontrado nos sistemas foi que, após os 8 dias de cultura, as células formavam aglomerados e eventualmente diminuía a velocidade de crescimento (CHEN *et al.*, 2006).

Biorreatores foram também usados para promover a diferenciação de MSC humanas para aplicações de engenharia de tecidos. Em um estudo foram testados biorreatores de frasco spinner, de paredes rotativas, de perfusão e rotativo biaxial, sendo que o último obteve maior proliferação celular, maior distribuição no suporte de policaprolactona/fosfato de tricálcio e maior capacidade de diferenciação osteogênica (ZHANG *et al.*, 2010). Frascos spinner também foram usados para proliferar MSCs em suportes de fibroína de seda

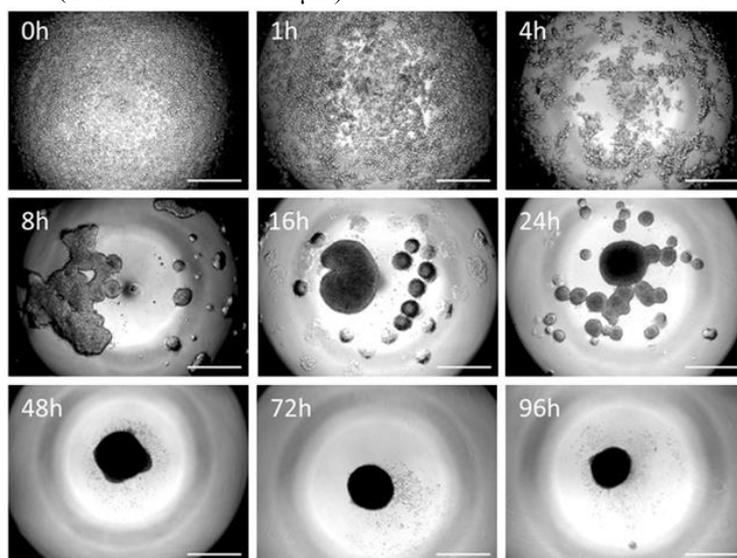
(HOFMANN *et al.*, 2007), em suportes de seda porosa (KIM *et al.*, 2007), em suportes de colágeno (MEINEL *et al.*, 2004) e em suportes de hidroxiapatita coralina (MYGIND *et al.*, 2007) obtendo melhores resultados de proliferação celular e diferenciação osteogênica em comparação com culturas estáticas. O reator de parede rotativa foi também usado com sucesso para a diferenciação osteogênica de células osteoblásticas em Cytodex[®] 3 e Biosilon[®] (GRANET *et al.*, 1998), de células osteoblásticas e células estromais da medula óssea de ratos em microesferas cerâmicas bioativas ocas (QIU; DUCHEYNE; AYYASWAMY, 1999), células osteoblásticas de crânio de coelho em suporte ósseo bioderivado (SONG *et al.*, 2006), de células mesenquimais precursoras da camada cambial em grânulos cerâmicos de hidroxiapatita (TURHANI *et al.*, 2005), de células estromais da medula óssea em suportes de seda porosa (MAROLT *et al.*, 2006), sendo que as últimas também foram testadas para a diferenciação condrogênica, porém sem muito sucesso em comparação à diferenciação osteogênica. Biorreatores de perfusão foram usados com sucesso para a diferenciação condrogênica de MSCs derivadas de células-tronco embrionárias humanas usando materiais preparados de suportes de seda de fibroína porosas (TIGLI *et al.*, 2011).

Uma nova abordagem recentemente descrita para o cultivo de MSCs não diferenciadas mostra células cultivadas como agregados tridimensionais ou esferoides (Figura 15), devido a estudos que indicam que tal cultivo aumenta o potencial terapêutico das MSCs quanto a sua capacidade anti-inflamatória, sendo os resultados observados *in vitro* e em modelo *in vivo* em ratos (BARTOSH *et al.*, 2010). A cultura de esferoides multicelulares de MSCs também foi testada em biorreator spinner e de paredes rotativas e comparada com a cultura estática bidimensional. Através de condições de crescimento e número celular otimizados, as células formaram esferoides multicelulares compactos com tamanho médio de 98,7 µm no frasco spinner e 31,7 µm no biorreator de paredes rotativas. Foram verificadas diferenças na expressão gênica, um aumento no potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica e expressão de antígenos alterada, não sendo verificado diferenças na viabilidade das células localizadas na superfície em relação as localizadas no centro do esferóide, sendo a viabilidade média das células comparável com a cultura estática, propondo assim a cultura tridimensional em esferoides como uma alternativa para os métodos usuais de monocamada (FRITH; THOMSON; GENEVER, 2010).

Com o objetivo de desenvolver um modelo *in vitro* de medula óssea para avaliar a leucemia, foi desenvolvido um sistema de cocultivo hematopoiético usando o biorreator de fibra oca. Neste modelo foram usadas uma linhagem celular estromal da medula

óssea humana imortalizada (HS-5) e uma linhagem celular humana de eritroleucemia (K562) (Figura 16). Com a capacidade de crescimento extensiva das células estromais nas superfícies das fibras ocas, foi possível atingir altos níveis de densidades celulares e contatos célula-célula entre as linhagens, possibilitando a simulação do microambiente da medula óssea (USULUDIN; CAO; LIM, 2012).

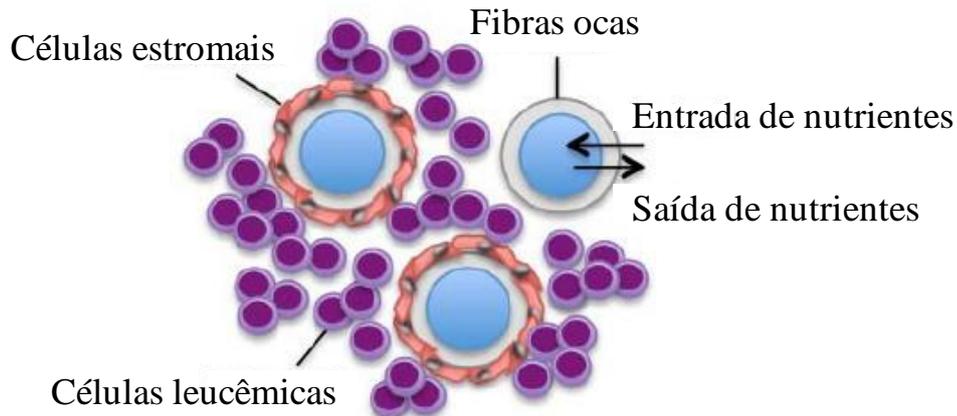
Figura 15 - Microscopia de contraste de fase mostrando a evolução no tempo da agregação de 25000 MSCs humanas em um esferoide (Barra de escala - 500 μ m).



(BARTOSH *et al.*, 2010).

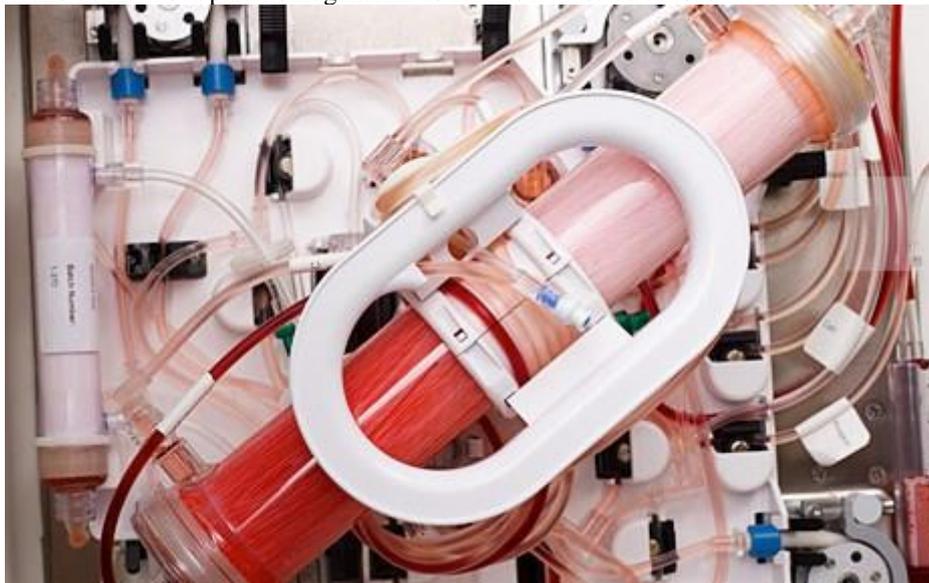
Em um estudo utilizando um novo sistema de expansão celular em biorreator de fibra oca (*Quantum[®] Cell Expansion System*, Terumo BCT, USA) (Figura 17) foi testado o cultivo de MSCs provenientes de aspirados não processados de medula óssea (cultura heterogênea) e de MSCs pré-cultivadas em frascos de cultivos (cultura homogênea). O cultivo consistiu no crescimento das células aderidas nas fibras do biorreator, e essa adesão era facilitada devido o uso de um revestimento de fibronectina, proteína de origem animal que é capaz de realizar ligações com a matriz extracelular. A partir de 8 a 32 mL de aspirados de medula óssea foram obtidos de 2 a 58×10^6 células em um período de 15 a 27 dias e o cultivo de MSCs pré-cultivadas levou a uma expansão de 10 a 20 vezes no período de 13 dias (NOLD *et al.*, 2013).

Figura 16 - Sistema de cocultivo hematopoiético em biorreator de fibra oca.



(USULUDIN; CAO; LIM, 2012).

Figura 17 – Quantum® Cell Expansion System. O sistema automatizado permite maior segurança contra contaminações e menor necessidade de mão-de-obra. O sistema também possui um mecanismo de rotação central do cartucho de fibra oca para homogeneizar as células na fase de adesão.



<http://www.terumobct.com/location/north-america/products-and-services/Pages/Quantum-Cell-Expansion-System.aspx> Acessado em: 20 de Abril de 2013.

3. 5 Comentários sobre a revisão bibliográfica

Existem diversos trabalhos sobre o estudo das MSCs, objetivando a sua expansão adequada *in vitro* e controle do seu potencial de diferenciação, porém ainda não foi desenvolvida uma estratégia de expansão em larga escala bem caracterizada e economicamente viável.

O sistema de biorreator de fibra oca construído sob medida para expansão de MSCs surge neste cenário como uma alternativa bastante atraente, devido a suas qualidades auxiliarem no cultivo de células aderentes sensíveis ao estresse mecânico, fato este comprovado pelo lançamento de opções comerciais de biorreatores com potencial de uso no cultivo de MSCs (FiberCell® e Quantum®). Outra qualidade importante refere-se a possibilidade de amenizar a formação de agregados de tamanhos que limitam a difusão de nutrientes (especialmente oxigênio) imprescindíveis para o crescimento celular.

A desvantagem do biorreator de fibra oca é a dificuldade no aumento de escala para volumes maiores com o objetivo de competir com biorreatores de tanque agitado de milhares de litros, porém, para o objetivo de cultivar MSCs para a terapia celular, volumes desse nível não são necessários.

Sendo assim, o presente estudo mostra-se oportuno nesse cenário ainda escasso de relatos na literatura para contribuir na busca de uma metodologia tecnicamente e economicamente viável de expansão e recuperação de MSCs para serem utilizadas em terapia celular. A principal diferença entre os sistemas comerciais apresentados e o sistema proposto é a redução do número de fibras a serem utilizadas e a adesão das MSCs, que ao invés de acontecer na superfície exterior ou interior das fibras ocas, será feita na superfície dos microcarregadores que ficarão retidos em um gel de suporte dentro do EEC. O fato de não terem sido encontrados relatos desta metodologia na literatura, contribui substancialmente com a originalidade e o ineditismo desta proposta de pesquisa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Célula estromal mesenquimal

Foi utilizado como modelo a linhagem de células estromais mesenquimais hMSC-TERT (*human Mesenchymal Stromal Cells - Telomerase Reverse Transcriptase*) derivadas da medula óssea humana. Devido a expressão da transcriptase reversa da telomerase, esta célula mantém as suas características funcionais e de crescimento após diversas duplicações. Esta linhagem também possui a expressão de GFP (*green fluorescent protein*), uma proteína que apresenta uma fluorescência verde quando atingida por luz ultravioleta, o que permite a visualização de células intactas em microscópio adequado (TSIEN, 1998).

Esta linhagem foi fornecida pelo Dr. Dimas Tadeu Covas e sua equipe da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP).

4.2 Meio de cultura

Para cultivo das MSCs foi utilizado meio de cultura α -MEM com vermelho de fenol, L-glutamina, ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos (Gibco, EUA) com adição de 15% de soro fetal bovino (HyClone[®], Thermo Scientific, EUA), 1g/L de D-glicose, 0,3654 g/L de L-glutamina, 0,4358 g/L de L-arginina, 5,9575 g/L de tampão HEPES, 0,8401 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) e 10 mL/L de antibiótico penicilina (5000U/mL)/estreptomicina (5000 μ g/mL) (Gibco, EUA). Para dissolução do meio foi utilizada água ultrapura do tipo 1 (Milli-Q[™]) obtida pelo sistema Simplicity (Millipore Corporation, EUA). Após a adição dos componentes o meio foi filtrado em membranas de 0,22 μ m.

4.3 Microcarregadores

O microcarregador utilizado nos cultivos foi o Cultispher[®]-S (PerCELL Biolytica AB, SWE). Trata-se de um microcarregador macroporoso de gelatina suína, com partículas com diâmetro variando entre 120 e 380 µm e densidade entre 1,02 e 1,04 g/cm³. Seu uso com MSC já foi relatado na literatura (YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007; EIBES *et al.*, 2010) e em estudos realizados no LATECC (SANCHES, 2010). Uma de suas importantes características é a sua digeribilidade em contato com enzimas facilitando a recuperação das células aderidas, neste trabalho para esta finalidade foi utilizada a enzima de origem não animal TrypLE[™] 10X (Gibco, EUA).

4.4 Biorreator de fibra oca

Foram utilizadas fibras de polissulfona e cilindros de policarbonato obtidos de módulos comerciais de fibra oca para filtração tangencial (GE Healthcare, GBR). As demais peças utilizadas foram confeccionadas pela oficina mecânica do Departamento de Química, UFSCar. A escolha da disposição de fibras resultou da necessidade de um espaço extracapilar onde fosse possível o trânsito livre e homogeneização de microcarregadores durante o inóculo e recuperação final, sem que existisse uma grande separação entre fibras. Tal separação provocaria a formação de regiões com baixos níveis de nutrientes, sendo o oxigênio o fator mais preocupante, devido ao seu baixo nível de solubilidade no meio de cultura. Para encontrar um valor apropriado da separação entre as fibras foi feita uma simulação do processo assumindo uma situação de estado estacionário em que a taxa de transporte de oxigênio é igual à taxa de consumo por respiração celular (detalhes desta modelagem estão descritos no item 4.14).

O adesivo estrutural LOCTITE E - 40FL epóxi (Henkel, DEU) foi utilizado para colar e fixar as fibras nos extremos para separar o espaço extracapilar do espaço intracapilar e fazer com que o escoamento de fluidos ocorra somente pela parte interior das fibras. Esse adesivo é coesivo e possui resistência a altas temperaturas.

O processo de montagem compõe-se basicamente em:

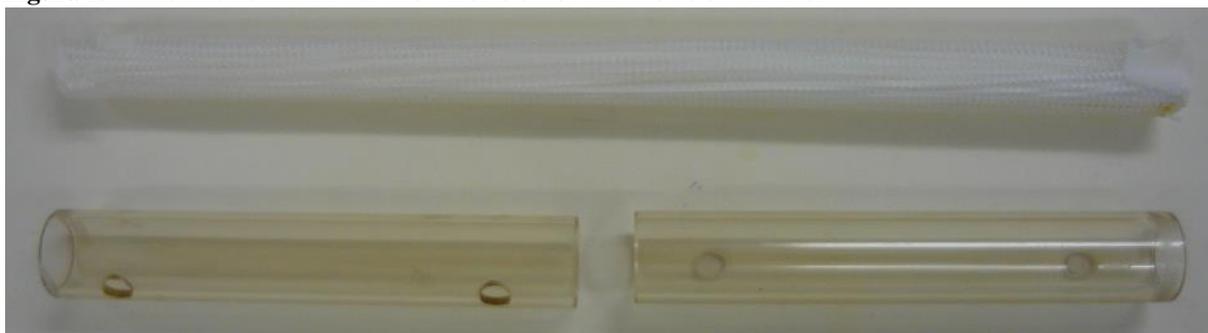
1) Corte do cilindro externo a partir de um modulo comercial de fibra oca (Figura 18) e perfuração para confecção de entradas de líquido (meio de cultivo com células) para o EEC (vide Figura 19). Os tubos obtidos, as fibras ocas soltas e os materiais confeccionados de policarbonato estão apresentados na Figura 20.

Figura 18 – Modulo comercial de filtração tangencial com aproximadamente 60 fibras ocas.



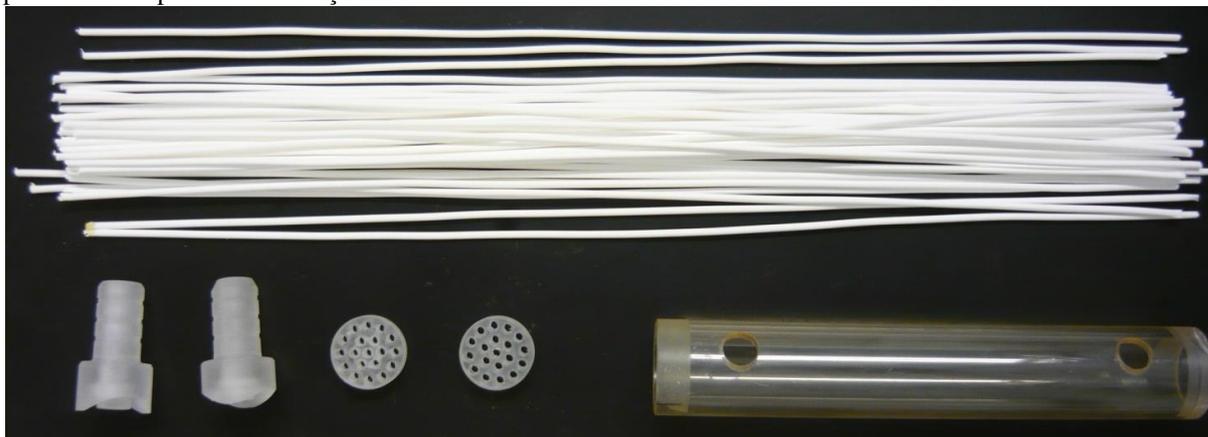
(Acervo pessoal)

Figura 19 – Modulo comercial cortado e fibras ocas retiradas do seu interior.



(Acervo pessoal)

Figura 20 - Tubo de policarbonato, fibras ocas soltas, dutos de policarbonato para a entrada do EEC e discos de policarbonato para uniformização da distância entre fibras.



(Acervo pessoal).

2) Além da colagem de dutos de policarbonato nos furos do cilindro externo para permitir o encaixe de mangueiras nas entradas do EEC, introduziram-se 19 fibras ocas

uniformemente distribuídas, como se demonstra na Figura 21.

3) Colagem final das fibras e discos de policarbonato com adesivo de epóxi para garantir a vedação do sistema, escoamento de meio de cultura oxigenado pelo interior das fibras e a distribuição uniforme das fibras no interior do cilindro (vide Figura 22).

4) Fixação nos extremos do cilindro externo de flanges com vedação para escoamento do meio de cultura através do espaço intracapilar como se mostra na Figura 23.

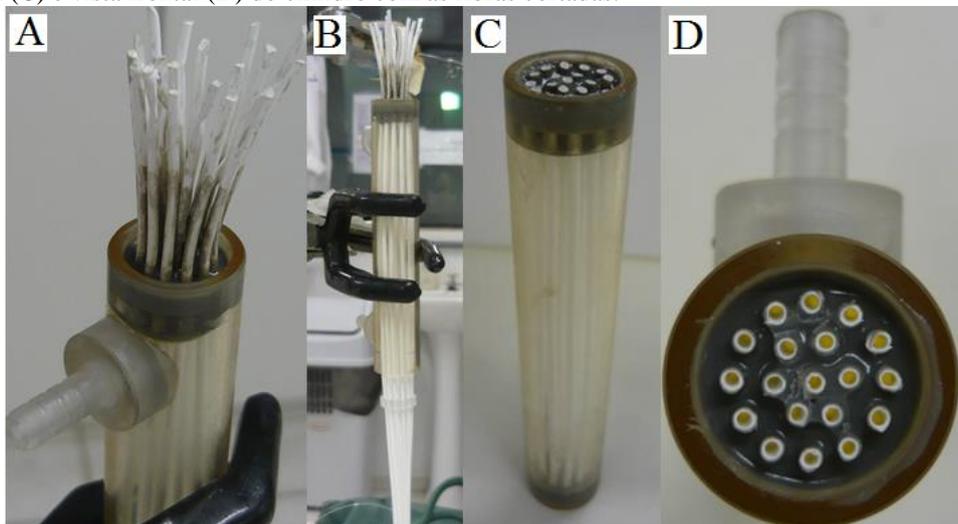
O biorreator final montado possui comprimento de 15 cm, diâmetro de 1,55 cm, espaço extracapilar de 13,5 mL, com 19 fibras de 8,8 cm com espaçamento médio entre elas de 2 mm. O sistema montado foi esterilizado por um processo de autoclavagem à 121°C por 30 minutos, sendo que após repetidas autoclavagens, foi observada uma alteração no posicionamento das fibras, motivando a troca do cilindro central e suas fibras por um novo conjunto.

Figura 21 - Colagem de dutos de policarbonatos e introdução de um conjunto de 19 fibras ocas no interior do tubo.



(Acervo pessoal).

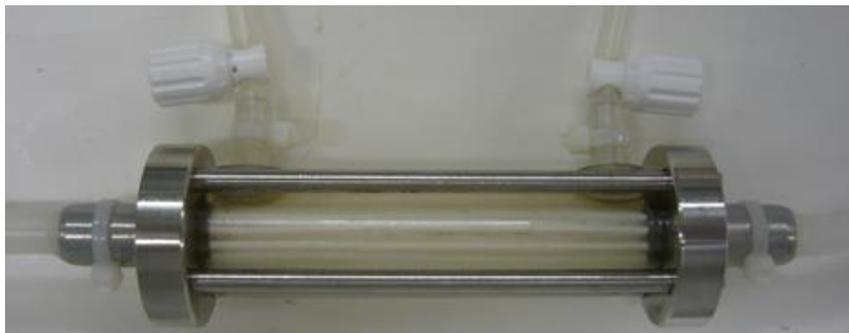
Figura 22 - Processo de colagem das fibras ocas. Vista superior (A) e vista lateral (B) das fibras recém coladas, vista lateral (C) e vista frontal (D) do cilindro com as fibras cortadas.



(Acervo pessoal).

Figura 23 - Biorreator montado com flanges de aço com vedação para escoamento do meio de cultura pelo

espaço intracapilar.



(Acervo pessoal).

4. 5 Preservação de células

As células foram preservadas em tubos de criogenia em nitrogênio líquido a -196°C . Para o congelamento, as células foram retiradas de culturas na fase de crescimento exponencial e centrifugadas a 1600 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio de congelamento, composto de 90% v/v de soro fetal bovino (HyClone[®], Thermo Scientific, EUA) e 10% v/v de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA). Foram congeladas primeiramente em ultrafreezer durante 24 horas em uma taxa de congelamento constante de -1°C por minuto promovido pela utilização de reservatório específico contendo álcool isopropílico, e então armazenado em nitrogênio líquido.

4. 6 Pré-cultivo

Para ativação das células o tubo de criogenia foi retirado do nitrogênio líquido e, após o descongelamento a temperatura ambiente, a suspensão de células foi transferida para um tubo de fundo cônico de centrifuga (BD, EUA) contendo 10 mL de meio de cultura e centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O meio de cultura foi em seguida descartado para remoção do DMSO, o pellet de células ressuspensas em meio de cultura foi transferido para uma garrafa de cultura de 75 cm² (TPP, SWE).

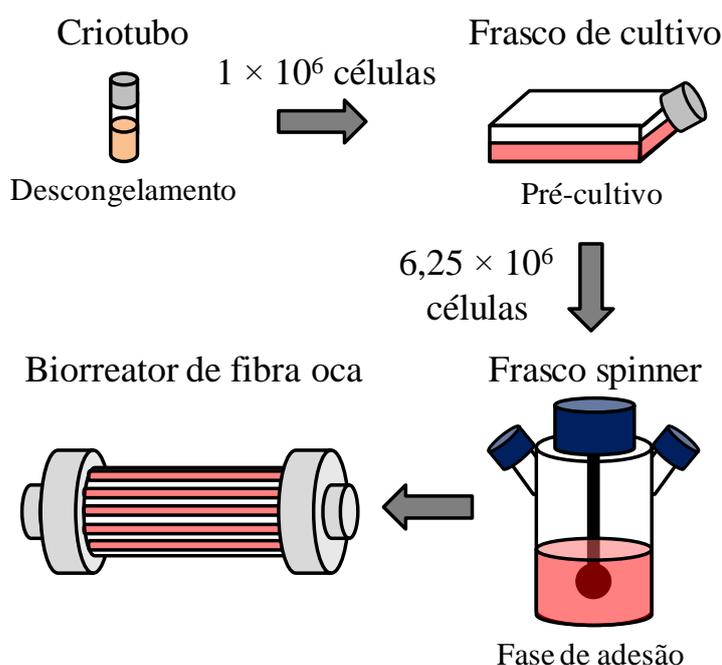
O cultivo em frascos e as passagens continuavam até as células atingirem um

número mínimo de $6,25 \times 10^6$ para o preparo do inóculo do biorreator. Foi definido o uso de no mínimo quatro frascos de 75 cm² para atingir este objetivo.

4. 7 Fase de adesão

Depois de obtidos os frascos de cultura com células em crescimento exponencial, o sobrenadante foi retirado, e os frascos lavados com PBS (*Phosphate Buffered Saline*, 8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,15 g/L Na₂HPO₄; 0,2 g/L K₂HPO₄ dissolvidos em água ultrapura tipo 1), para que fosse feita a adição da enzima TrypLE (Gibco, EUA), que promove a dissociação entre as células e a superfície dos frascos de cultura. Após as células serem suspensas em meio de cultura e definida a sua densidade e viabilidade, a quantidade de $6,25 \times 10^6$ células foi inoculada em frasco spinner (Bellco Glass, EUA) com 50 mL de meio α -MEM e 4 g/L de Cultispher-S para a realização da fase de adesão das células nos microcarregadores, realizando uma agitação intermitente, visando uma distribuição homogênea de células nos microcarregadores. Estas etapas estão esquematizadas na Figura 24.

Figura 24 - Esquema completo de cultivo das células hMSC-TERT para realização de experimentos com o biorreator de fibra oca.



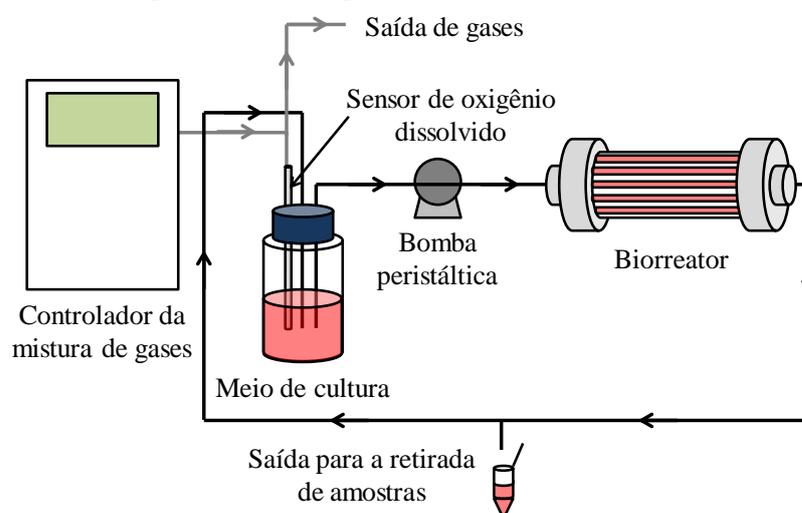
(Acervo pessoal)

4. 8 Cultivo em biorreator de fibra oca

Após a adesão das células, o meio de cultura retirado do frasco spinner com microcarregadores foi suplementado com uma solução autoclavada de CaCl_2 1M (Sigma-Aldrich, EUA) até atingir 4,25 ou 4,5 mM, após a homogenização foi adicionada uma solução autoclavada de alginato de sódio de baixa viscosidade (Sigma-Aldrich, EUA) 60 g/L visando uma concentração final de 12 g/L. Com o contato entre CaCl_2 e alginato foi induzida a geleificação da mistura gerando um líquido altamente viscoso de fácil manuseio que impediu a sedimentação dos microcarregadores no EEC. Este gel contendo os microcarregadores foi então inoculado no biorreator de fibra oca através dos dutos de entrada para o EEC preenchendo todo o volume dele e ficou retido nele até o final do cultivo. Este gel ficou em contato através das paredes porosas das fibras ocas com o meio de cultura oxigenado que escoava continuamente pelo interior das fibras. A direção e intensidade do fluxo eram controladas por uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, GBR). No final do cultivo este gel de inoculação era retirado após uma desgelificação provocada pelo fluxo de PBS com 50 mM de EDTA (J. T. Baker, EUA), um quelante de cálcio.

O sistema de cultivo também possuía um sensor de oxigênio localizado no frasco com meio de cultura e um controlador de mistura de gases, para a injeção de oxigênio ou nitrogênio para o controle da quantidade de oxigênio presente no meio circulante como se ilustra nas Figuras 25 e 26. O volume de meio de cultura nesta fase foi de 200 mL.

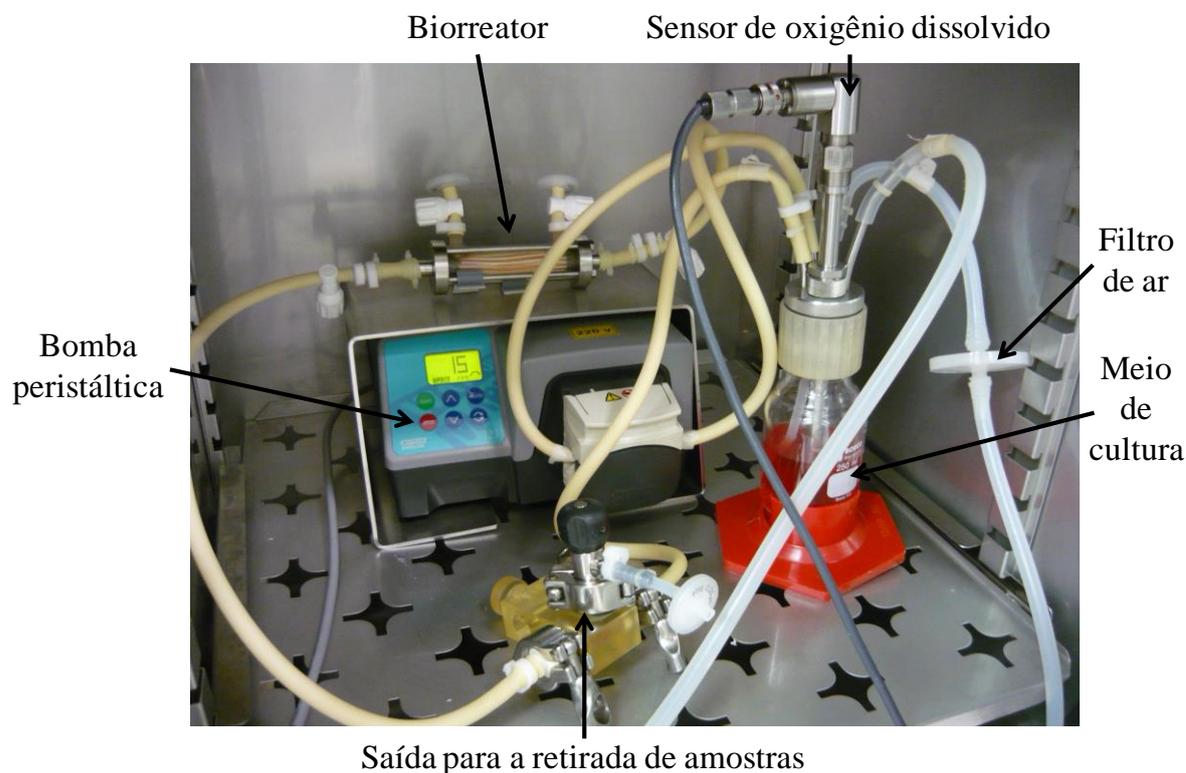
Figura 25 – Esquema do cultivo utilizando o biorreator de fibra oca e seus acessórios. Este conjunto era colocado em incubadora de CO_2 para manter a temperatura constante (37°C) durante o cultivo.



(Acervo pessoal)

Figura 26 - Sistema de cultivo em biorreator de fibra oca no interior de uma incubadora de CO_2 para

manutenção da temperatura constante (37°C) durante o cultivo.



(Acervo pessoal)

4.9 Cultivos realizados

Na Tabela 1 está resumido o conjunto de experimentos realizados com a finalidade de avaliar o comportamento do biorreator de fibra oca na expansão de MSCs. Por ser um biorreator com configuração pouco comum não existem dados disponíveis na literatura, tornando necessário a realização de um trabalho exploratório para a definição de importantes características do pré-cultivo antes do inóculo e cultivo de MSC aderidas em Cultispher-S no biorreator de fibra oca. No primeiro experimento foi utilizada uma placa de poços para observar múltiplos cultivos e calcular de forma confiável o valor de $Y_{x/s}$ (maiores descrições no item 4.13). No segundo e terceiro experimentos foi utilizado o frasco spinner, sem análise do cultivo em biorreator de fibra oca devido a necessidade de padronizar as condições de cultivo no biorreator e finalizar a montagem do seu sistema. No quarto e quinto experimentos foram utilizados frascos spinner de 100 mL, sendo o volume do meio α -MEM de 50 mL. Com esses experimentos foi possível analisar a velocidade de crescimento da MSC no biorreator de fibra oca, tornando possível a adoção de uma metodologia mais eficaz de

cultivo a ser usada nos experimentos subsequentes. No sexto e sétimo, foram usados frascos spinner de 500 mL, sendo o volume de meio α -MEM utilizado de 50 mL, a fase de cultivo em spinner foi reduzida e também foi testado o cultivo com uma concentração maior de oxigênio no meio de cultura que circulava através do espaço intracapilar do biorreator de fibra oca. No sétimo experimento foi alterada a composição do gel de inoculação em relação à concentração final de CaCl_2 de 4,5 mM para 4,25 mM e à quantidade de volume de meio no gel de 50% para 80% v/v, visando obter um líquido um pouco menos viscoso e com maior porcentagem de nutrientes para o período de transição entre reatores. Somente no sétimo foi utilizada uma mangueira com maior diâmetro para obter aproximadamente a mesma vazão de meio com uma menor rotação com o objetivo de reduzir possíveis problemas de desgaste e de vazamentos de meio de cultura.

Tabela 1 - Resumo dos experimentos realizados em unicata.

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7
Equipamentos	Placa de poços	FS ^A	FS ^A	FS ^A /HF ^B			
Volume do frasco spinner (mL)	-	100	100	100	100	500	500
Duração da fase em spinner (horas)	-	-	-	48	48	8	8
Rotação da bomba (rpm) / diâmetro da mangueira(mm)	-	-	-	15 / 6.4	15-85 / 6.4	85 / 6.4	40 / 8.0
Oxigenação (%)	-	-	-	70%	70%	70-90%	90%
Realizado análise em CLAE	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim

^A = frasco spinner, ^B = biorreator de fibra oca.

4. 10 Análise de densidade e viabilidade celular

Para a análise de viabilidade e densidade de células foi utilizado o método de

exclusão do corante azul de tripan (solução 0,4%, GIBCO, EUA) em hemacitômetro (DOYLE; GRIFFITHS, 1998).

4. 11 Determinação da concentração de células viáveis pelo método baseado no MTT

Utilizou-se o método colorimétrico do MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para quantificação da população viável de células. Este método se baseia na atividade da enzima mitocondrial desidrogenase que reduz o MTT (amarelo) ao formazan (roxo). Para a aplicação do kit de ensaio toxicológico *in vitro* baseado no MTT (Sigma-Aldrich, EUA) foi preparada uma curva de calibração da densidade celular em função da absorbância logo no início da fase de adesão com células restantes não usadas no inóculo em biorreator. Com base nessa curva foi possível determinar a densidade celular no período de adesão e no final de cada experimento.

4. 12 Análise de glicose, lactato, aminoácidos e amônia

Durante o experimento foi feita a retirada de amostras do sobrenadante que foram estocadas a -20°C para posterior análise de níveis de glicose, lactato, aminoácidos e amônia. Para análise de carboidratos utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna de resina Aminex HPX-87H (Bio-rad, EUA), fase móvel H₂SO₄ 5mM, temperatura de 65°C e fluxo de 0,6 mL/min em cromatógrafo Waters com detecção através do índice de refração (W410) para carboidratos e UV 210 nm para lactato. A análise de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizou uma coluna pico-tag (Waters, IRL) como fase estacionária e como eluente foi utilizado um gradiente constituído por duas fases móveis A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado 17,86 g/L (J. T. Baker, EUA), trietilamina 0,047 % v/v (Sigma-Aldrich, EUA), EDTA 0,0188 % v/v e acetonitrila 6 % v/v (Panreac, ESP) em água ultrapura tipo 1. A fase B, apenas acetonitrila 60% v/v e EDTA 0,02% v/v em água ultrapura tipo 1. 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.

O bioanalizador YSI-7100 MBS (*Multiparameter Bionanalytical System*, Yellow Springs Instruments, EUA) foi também utilizado para uma análise rápida e contínua de glicose, ácido láctico, glutamina e glutamato. Sua metodologia baseia-se na produção de peróxido de hidrogênio pela enzima oxidase imobilizada em membranas na presença do substrato. O peróxido é então oxidado em um ânodo de platina produzindo elétrons em uma taxa constante e proporcional à quantidade de substrato, sendo assim a concentração do substrato definida.

As análises de amônia foram feitas com eletrodo íon seletivo. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A, foi utilizado para obter as medidas de milivoltagem.

4. 13 Estimativa do número de células no biorreator de fibra oca

Para se estimar o número de células retidas no gel de inoculação no EEC do biorreator de fibra oca foi usado um modelo matemático baseado no $Y_{x/s}$ (fator de rendimento celular em nutrientes), partindo da hipótese de que em crescimento o valor do $Y_{x/s}$ se mantém praticamente constante (DOYLE; GRIFFITHS, 1998).

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

$$Y_{x/s} = \frac{N_t - N_0}{n_{s0} - n_{st}} \quad (4. 1)$$

onde:

$Y_{x/s}$ = fator de rendimento celular com relação a um substrato

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

N_0 = quantidade de células no início do processo de crescimento

n_{s0} = quantidade em mols de substrato no início do processo de crescimento

n_{st} = quantidade em mols de substrato depois de um tempo t de crescimento

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

$$N_t = N_0 + Y_{x/s} (n_{s0} - n_{st}) \quad (4.2)$$

Para se obter valores confiáveis de $Y_{x/s}$ foi realizado um experimento em placas e calculado os seus valores na fase de crescimento, com este valor se torna possível quantificar o número de células no biorreator a partir da quantificação de nutrientes pelo YSI-7100 MBS feitas na mesma hora da amostragem.

4. 14 Simulação do perfil de concentração de oxigênio no espaço extracapilar

No biorreator de fibra oca os nutrientes, incluindo o oxigênio, foram fornecidos através do meio de cultura bombeado pelo interior das fibras ocas. Os nutrientes difundiam para o meio geleificado através dos poros das fibras ocas. No espaço existente entre duas fibras a concentração dos nutrientes deverá variar com a distância devido à contribuição dos efeitos difusivos e de consumo pelas células. Considerando oxigênio como o substrato mais limitante do crescimento por ser o de menor solubilidade no meio de cultura e por não ser renovado nas trocas de meio efetuadas durante os cultivos, então o balanço de massa utilizado na simulação do comportamento foi o desse substrato no interior do espaço extracapilar durante o crescimento de células hMSC-TERT. O esquema representativo do perfis de nutrientes e metabólitos no interior do EEC está apresentado na figura 27.

A simulação de tais biorreatores é geralmente realizada fazendo uso de um modelo de transferência de massa para o oxigênio (considerando cinética de Monod), correspondente à equação 4. 3, obtida a partir de uma simplificação da equação geral de balanço de massa que iguala a diferença difusiva de oxigênio no eixo z ao consumo do mesmo pelas células:

$$D_o \left(\frac{d^2 C_o}{dz^2} \right) = V_{\max} \frac{C_o}{K_m + C_o} \quad (4.3)$$

com as seguintes condições de contorno (C. C):

C. C 1: para $z = 0$, $C_o = C_{OL}$

C. C 2: para $z = L$, $C_o = C_{OL}$

onde:

D_o = difusividade efetiva de oxigênio no gel de inoculação (cm^2/s)

C_o = concentração local de oxigênio (moles de O_2/cm^3)

C_{OL} = concentração de oxigênio no meio de cultivo circulante (moles de O_2/cm^3)

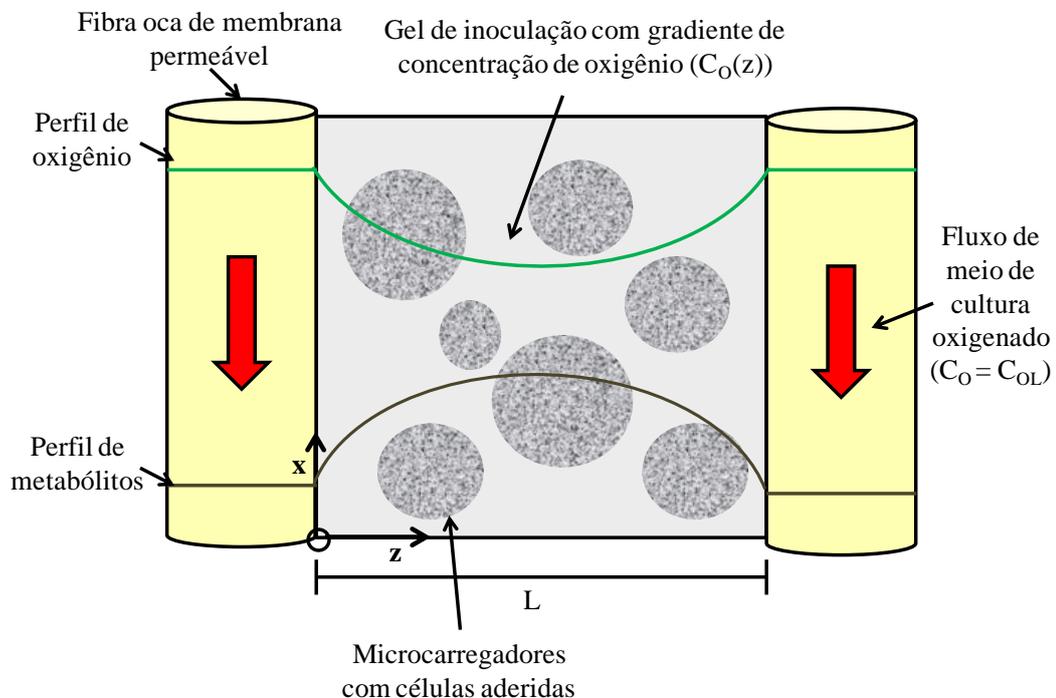
V_{\max} = taxa máxima de consumo de O_2 pela respiração celular (moles de $\text{O}_2/\text{s} \cdot \text{cm}^3$)

K_m = constante de Monod de consumo de oxigênio (moles de O_2/cm^3)

z = distância em relação à fibra oca (cm)

L = distância entre duas fibras ocas (cm)

Figura 27 – Esquema do processo difusivo de nutrientes (representado pelo oxigênio) e metabólitos na região entre duas fibras ocas no EEC.



(Acervo pessoal)

As C. C 1 e 2 definem que a concentração de oxigênio dissolvido na interface da fibra/espaco intracapilar é igual à concentração presente no meio que flui no interior das

fibras, sendo válidas, portanto, para uma resistência ao transporte de oxigênio desprezível na parede da fibra e no fluido circulante

A equação 4. 3 e suas condições de contorno foram resolvidas pelo método das diferenças finitas, que corresponde à discretização da distância L, entre fibras, em N pontos. Para a aproximação do termo diferencial de segunda ordem presente na equação 4. 3 foi utilizada uma diferença finita central conforme se descreve a seguir:

$$\frac{d^2C_o}{dz^2} = \frac{C_o(z+1) - 2C_o(z) + C_o(z-1)}{\Delta z^2} \quad (4.4)$$

Substituindo 4. 4 em 4. 3:

$$C_o(z+1) - 2C_o(z) + C_o(z-1) = \frac{\Delta z^2 V_{\max} C_o(z)}{D_o (K_m + C_o(z))} \quad (4.5)$$

Esta equação algébrica não linear é válida para todos os pontos internos de discretização, entre 0 e L, isto é, para os pontos entre $z = 2$ e $z = N-1$. Já para os pontos “externos”, isto é, para $z = 1$ e $z = N$ (condições de contorno), tem-se:

$$C_o(z) - C_{OL} = 0 \quad (4.6)$$

O sistema de equações algébricas não-lineares compostas pelas equações 4. 5 e 4. 6 foi resolvido pelo método clássico de Newton-Raphson, para 40 pontos de discretização, no programa Scilab (Scilab enterprises, FRA). Os valores utilizados para os parâmetros presentes nas equações serão descritos a seguir.

O valor da difusividade efetiva de oxigênio em uma matriz celular foi documentado como sendo aproximadamente 50% do valor da difusividade de oxigênio em água (CHOW *et al.*, 2001). Portanto, como é usado um gel de inoculação para prender as células o valor de difusividade escolhido foi o de 50% ($1,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$). A C_{OL} foi definida como a concentração em um meio de cultura com 70% de saturação de ar ($C_{O_{\text{sat}}} = 0,20 \text{ mM}$, então $C_{OL} = 0,7 \times 0,20 \text{ mM} = 1,4 \times 10^{-7} \text{ moles de O}_2/\text{cm}^3$) (ZHAO *et al.*, 2005). A velocidade máxima de consumo de oxigênio foi obtida mediante a equação:

$$V_{\max} = q_{O_2} \cdot C_x \quad (4.7)$$

onde:

q_{O_2} = taxa de consumo celular de oxigênio (moles de O_2 consumido/s · célula)

C_x = concentração celular (células/mL)

O valor de q_{O_2} encontrado na literatura foi de $3,14 \times 10^{-17}$ moles de O_2 consumido/s · célula (PATTAPA *et al.*, 2011) sendo ele utilizado com diferentes C_x simulando o momento do inóculo até uma etapa com um número maior de células. O valor de K_m encontrado na literatura para MSCs é de 1.1×10^{-8} mol/cm³ (ZHAO *et al.*, 2005).

4. 15 Velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\mu = \frac{\ln(N_{t_2}/N_{t_1})}{t_2 - t_1} \quad (4.8)$$

onde:

μ = velocidade específica de crescimento

N_{t_1} = número de células no tempo 1

N_{t_2} = número de células no tempo 2

t_1 = tempo 1

t_2 = tempo 2

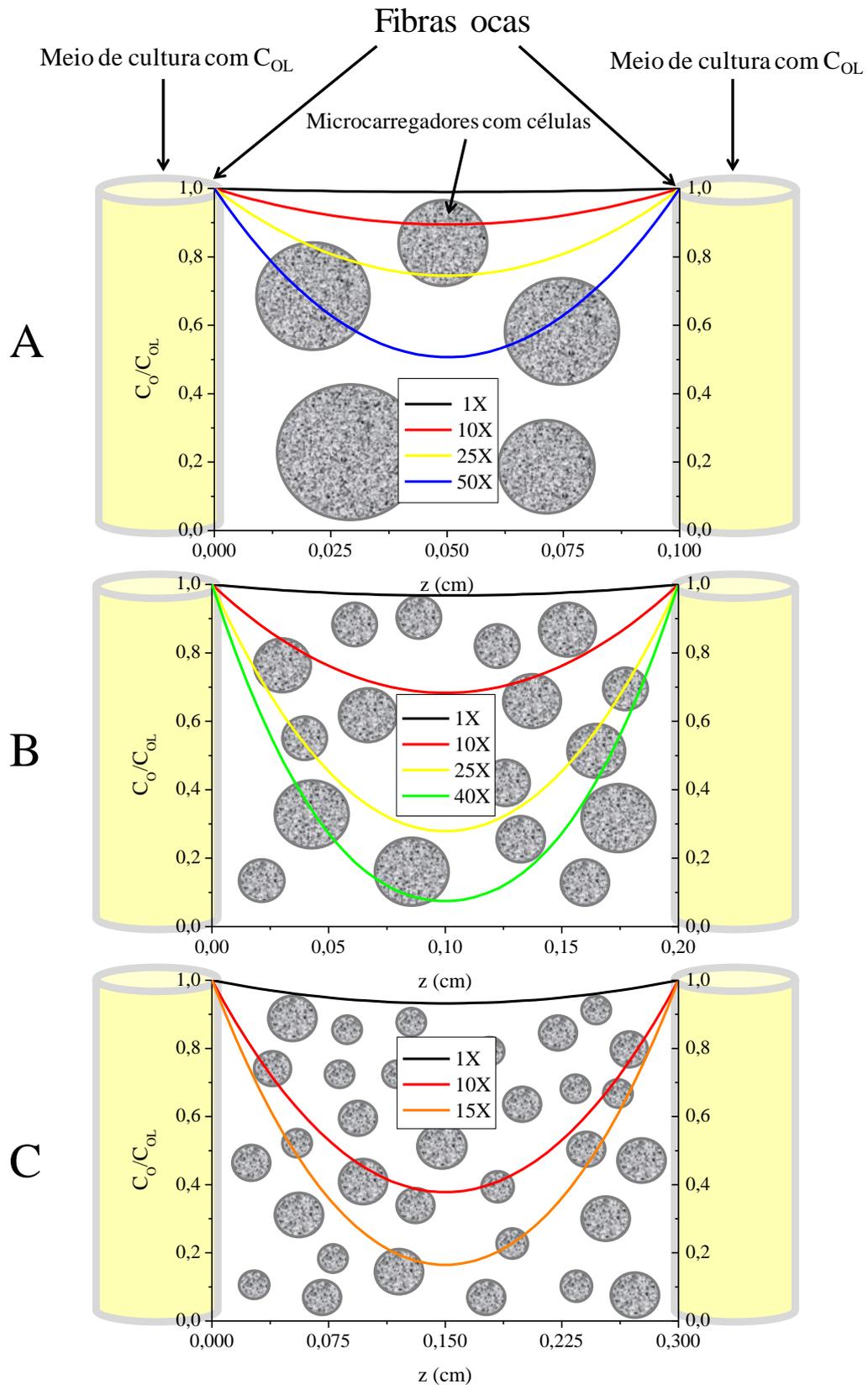
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como a construção do biorreator se baseou em um arranjo não existente comercialmente, especialmente no que se refere ao tamanho e ao espaçamento das fibras ocas, mostrar-se-á primeiro como se chegou a uma separação otimizada para construir um protótipo de biorreator e fazer a expansão da linhagem hMSC-TERT numa escala que permitisse validar o princípio de operação do biorreator, com células suspensas e imobilizadas em gel (evitando assim colisões entre microcarregadores e a formação de aglomerados) com baixo consumo de meio de cultura e, portanto, com custo baixo. Em seguida serão apresentados os resultados dos experimentos preliminares e de cultivos em biorreator e os aprimoramentos realizados em ordem cronológica. Convém lembrar que, por ser um biorreator projetado especialmente para o cultivo de MSCs, possuindo características muito singulares, não existem dados de cultivo que possam servir de referência. Por esta razão, foram realizados alguns experimentos de cultivo preliminares visando à validação de materiais e procedimentos que seriam utilizados nos cultivos com o biorreator de fibra oca. No final desta seção se encontra o resumo dos resultados obtidos em todos os cultivos apresentados e é feita uma comparação do desempenho do biorreator proposto com os resultados relatados na literatura.

5.1 Perfis de oxigênio no espaço extracapilar

Com as equações 4.5 e 4.6 e utilizando o programa Scilab foi possível a obtenção dos perfis simulados da concentração de oxigênio dissolvido no EEC, sendo os valores obtidos utilizados para preparar a Figura 28, o valor indicado por 1X é igual a uma concentração de células próxima ao inóculo (para um total de $6,75 \times 10^6$ células no volume do EEC disponível, que varia devido a quantidade de fibras), sendo também calculado para concentrações maiores sendo a fator de multiplicação indicado na legenda da figura. O tamanho representativo dos microcarregadores foi mantido em escala para facilitar a comparação entre os diferentes espaçamentos. Para a montagem de um biorreator com espaçamento próximo de 1 mm entre fibras seria necessário 37 fibras, para 2 mm, 19 fibras, e para 3 mm, 12 fibras.

Figura 28 - Perfis de concentração de oxigênio entre duas fibras ocas no EEC do biorreator em diferentes valores de concentração celular, sendo a distância entre fibras de 1 (A), 2 (B) e 3 mm (C). A concentração celular do inóculo (1X) é de $6,75 \times 10^6$ células/ volume do EEC. $C_{OL} = 1,4 \times 10^{-7}$ moles de O_2/cm^3 .



(Acervo pessoal)

Com o distanciamento de 1 mm, mesmo em uma concentração de células 50 vezes maior do que a inicial, a concentração de oxigênio dissolvido não atingiu valores menores do que 50% da concentração do meio de cultura circulante no espaço intracapilar, porém devido ao baixo espaçamento ocorreria possivelmente uma heterogeneidade na distribuição dos microcarregadores devido à retenção daqueles de maior diâmetro e dos pequenos aglomerados provenientes da fase de adesão. Essa retenção provavelmente ocorreria nas regiões próximas ao local de inoculação ou nas extremidades do EEC no biorreator.

Nos distanciamentos de 2 e 3 mm, uma retenção de microcarregadores se torna improvável. Porém, com 3 mm e com um número 15 vezes maior de células já se atingiu valores próximos de 20%, limitando assim o processo de expansão no biorreator, sendo que uma expansão acima de 15 vezes é possível levando em consideração a área útil dos microcarregadores. Com 2 mm, concentrações baixas de oxigênio (10%) só foram atingidas com um número 40 vezes maior de células que o inicial.

Com base nas simulações realizadas foi possível escolher o espaçamento de 2 mm como o valor inicial adotado na construção do biorreator utilizado nos experimentos de cultivo, devido ao fato dele permitir um livre trânsito e homogeneização dos microcarregadores sem a presença de regiões com baixo nível de oxigênio dissolvido.

5. 2 Determinação de valores de $Y_{x/s}$ em placa de poços – Experimento 1

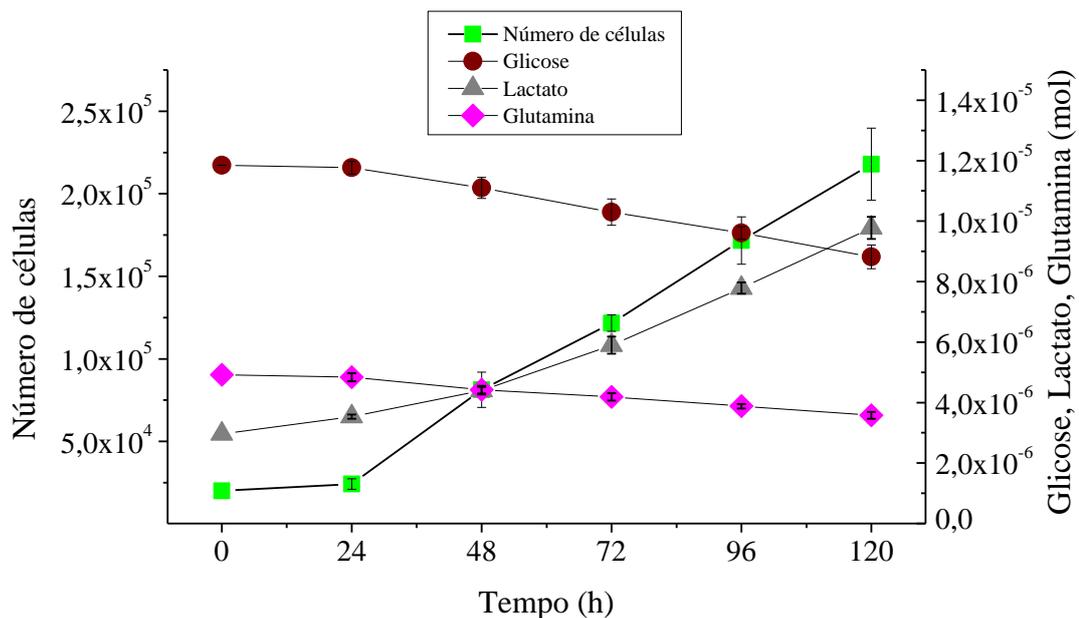
Uma característica bem conhecida do biorreator de fibra oca é a impossibilidade de acompanhamento da concentração de células durante o crescimento celular devido à dificuldade de amostragem. Como se trata da variável mais relevante do processo de cultivo de células, a procura de uma metodologia para sua estimativa de forma confiável e rápida torna-se imprescindível para qualquer tipo de estudo. Neste trabalho optou-se por utilizar o valor de $Y_{x/s}$, já que o mesmo estava bastante acessível através de dados de concentração de substratos coletados para acompanhamento do cultivo. O valor de $Y_{x/s}$ normalmente se mantém constante quando as variações ambientais em torno das células são pequenas, fazendo com que o metabolismo celular se mantenha pouco alterado.

Se o valor de $Y_{x/s}$ é constante, é possível através de sua definição correlacionar a concentração de substrato limitante do crescimento celular com a concentração celular, a

qual pode ser calculada de forma muito simples utilizando a equação descrita no item 4. 13. Este experimento foi realizado em placas de cultivo de 24 poços (TPP, SWE) para se obter valores da razão de consumo de nutrientes e produção de metabólitos feitos pela linhagem hMSC-TERT na fase exponencial de crescimento, após a adesão na superfície da placa.

A partir destes dados foram feitas todas as estimativas do número de células durante os cultivos em biorreator de fibra oca, já que na utilização deste equipamento não era possível retirar amostras com microcarregadores para se medir a densidade celular através da metodologia baseada no MTT. Os resultados experimentais obtidos em placas de cultivo são mostrados na Figura 29 a seguir e nas tabelas B1 e B2 (item 8.2). A velocidade específica de crescimento (μ) entre 24 e 120 horas foi de $0,0229 \text{ h}^{-1}$.

Figura 29 - Resultados do experimento 1 realizados em placas de poliestireno de 24 poços tratadas para promover a adesão celular. No cultivo utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino com inóculo de 2×10^4 células/mL em incubadora com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C . O número de células foi determinado pela contagem em hemacitômetro e a quantificação de nutrientes através de medidas no bioanalisador YSI-7100 MBS. Os valores apresentados são a média e desvio padrão obtido da utilização da amostragem de 3 poços por dia.

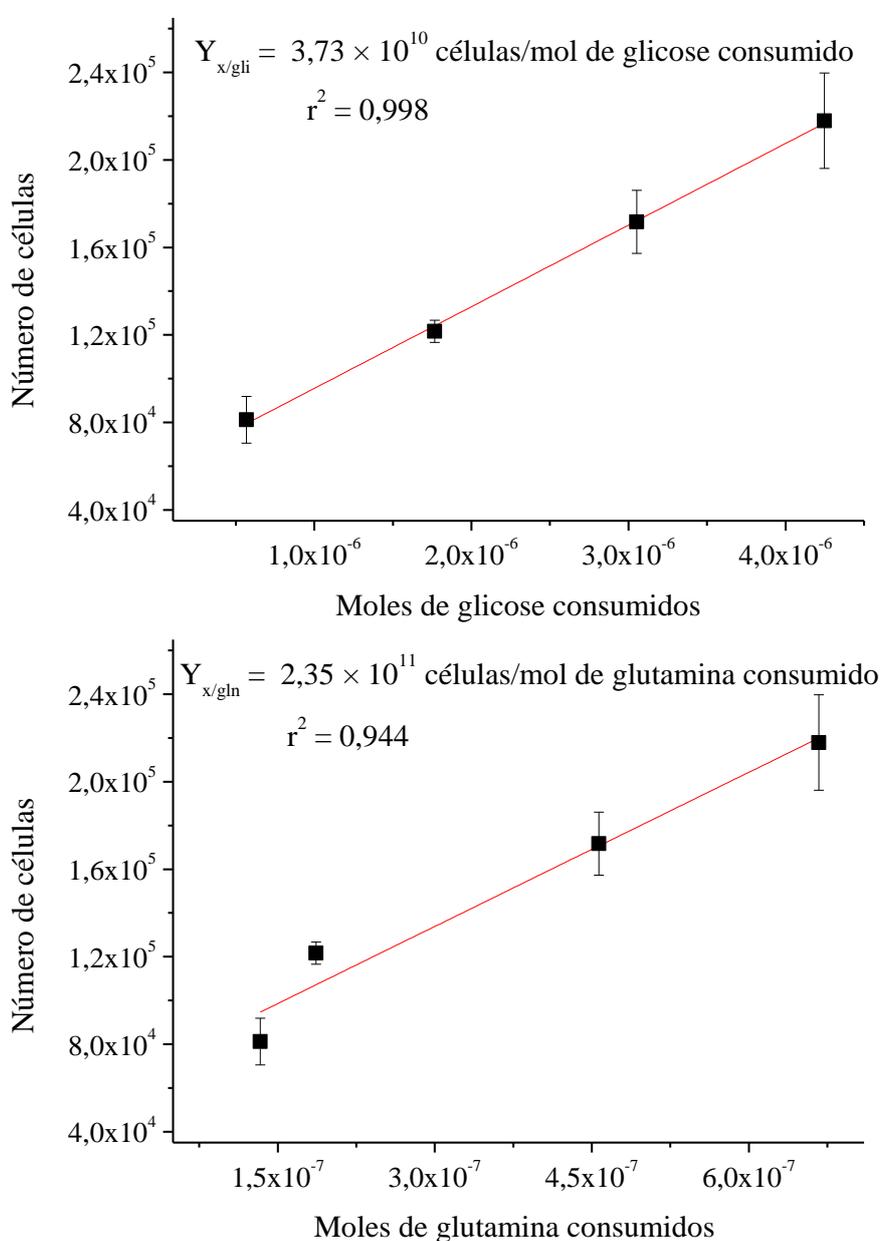


(Acervo pessoal)

Os resultados dos coeficientes de rendimento ($Y_{x/s}$) obtidos na fase de crescimento exponencial neste experimento (de 24 até 120 horas) foram: $Y_{x/gli} = 3,73 \times 10^{10}$ células/mol de glicose consumido e $Y_{x/gln} = 2,03 \times 10^{11}$ células/mol de glutamina consumido como se mostra na Figura 30. O coeficiente $Y_{x/gli}$ mostrou-se bastante coerente e confiável uma vez que a correlação entre as duas variáveis foi de 0,998. No caso da glutamina a correlação não foi muito boa (0,944) tendo que se recorrer a utilização de uma linha reta

média já que em baixas concentrações de glutamina parece haver uma mudança de metabolismo que precisa ser confirmada e estudada de forma mais detalhada. Devido aos resultados obtidos e facilidade de análise confiável padronizou-se a utilização do $Y_{x/gli}$ como método para a estimativa do número de células no cultivo em biorreator de fibra oca.

Figura 30 - Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{x/gli}$ e $Y_{x/gln}$ utilizando dados da linhagem hMSC-TERT cultivada em meio de cultura α -MEM em placas de 24 poços em incubadora com 5% de CO_2 a 37°C. Os dados de cultivos são os apresentados na Figura 26. Os valores de $Y_{x/gli}$ e $Y_{x/gln}$ foram calculados a partir da inclinação das relações lineares obtidas para ambos os substratos. Os pontos no gráfico são as médias e desvio padrão de medidas realizadas em triplicata.

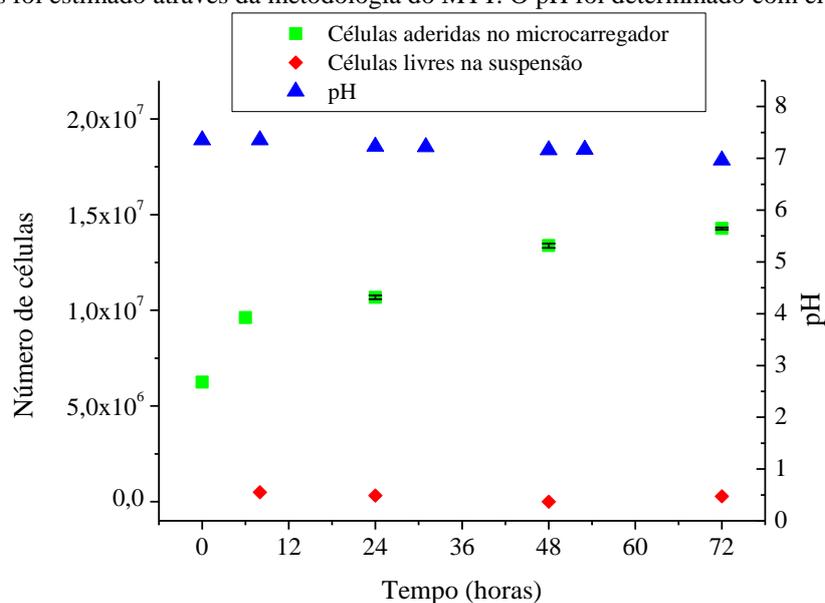


(Acervo pessoal)

5.3 Cultivos em frasco spinner

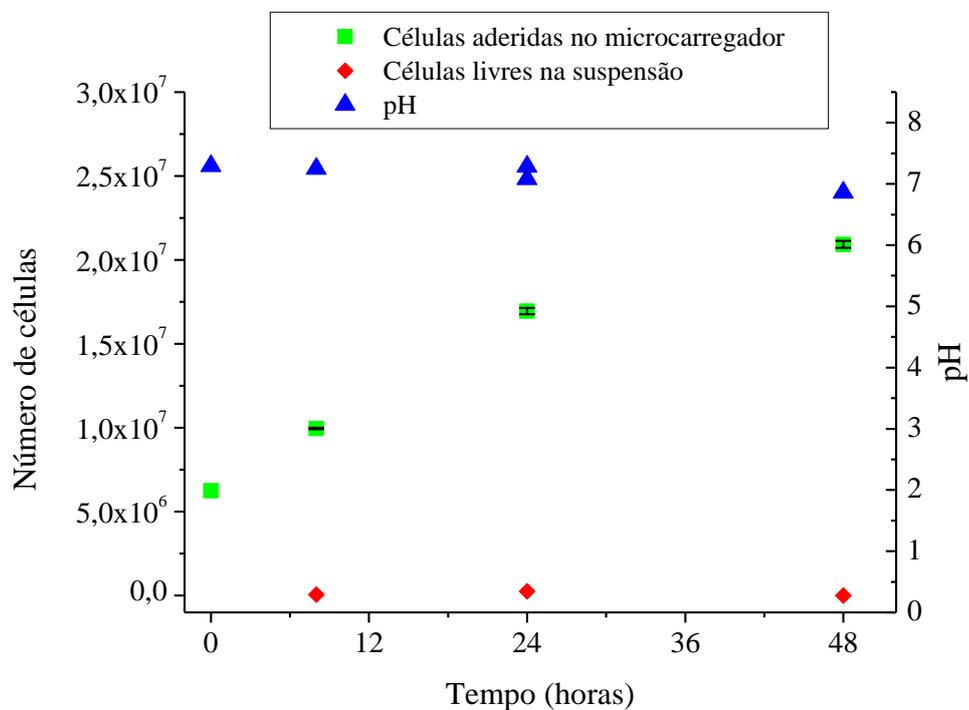
Ambos os cultivos em frasco spinner ocorreram de forma satisfatória, verificando-se a adesão das MSCs nos microcarregadores e seu crescimento. No experimento 2 após 72 horas foi realizada a inoculação em biorreator de fibra oca, porém antes de completar 96 horas de experimento foi verificada uma turbidez alta no meio de cultivo indicando a contaminação do experimento. Apesar da interrupção do experimento foi possível aproveitar os resultados para analisar a expansão em frasco spinner. No experimento 3 após 48 horas foi realizada a inoculação em biorreator de fibra oca, porém com 96 horas de experimento ele teve de ser descontinuado devido a um vazamento na mangueira de silicone do sistema de bombeamento de meio de cultura, devido a esse fato optou-se por utilizar para os experimentos seguintes, um tipo mais resistente conhecido como mangueira de Bioprene (Watson-Marlow, GBR). Em ambos os experimentos, foi observado valores inferiores de velocidade específica de crescimento no frasco spinner em relação ao ambiente estático do experimento 1, sendo eles de $0,0061 \text{ h}^{-1}$ entre 8 e 72 horas (experimento 2) e $0,0185 \text{ h}^{-1}$ entre 8 e 48 horas (experimento 3), indicando que o ambiente agitado não foi favorável a expansão. Os resultados estão apresentados na figura 31 e 32 a seguir e tabelas B3 e B4 (item 8.2).

Figura 31 - Resultados obtidos no Experimento 2 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 72 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. No cultivo utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C . O número de células aderidas foi estimado através da metodologia do MTT. O pH foi determinado com eletrodo padrão.



(Acervo pessoal)

Figura 32 - Resultados obtidos no Experimento 3 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 48 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. No cultivo utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas foi obtido através da metodologia do MTT. O pH foi determinado com eletrodo padrão.



(Acervo pessoal)

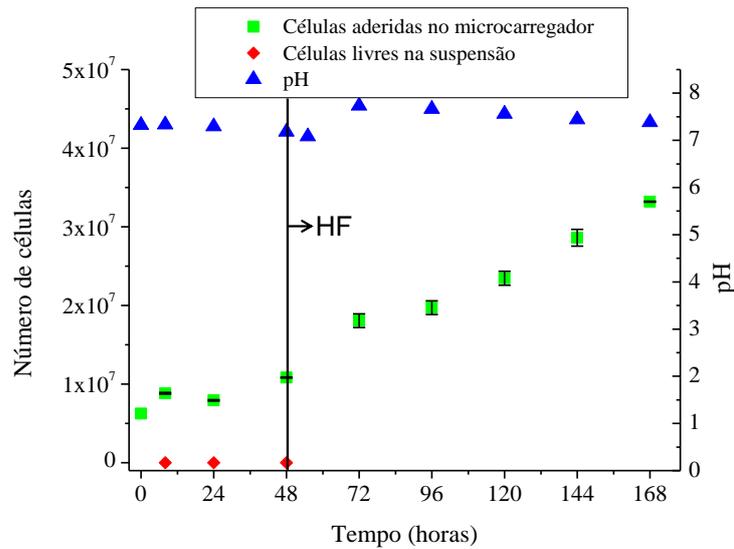
5. 4 Cultivos no biorreator de fibra oca

5. 4. 1 Experimento 4 e 5

Após algumas melhorias feitas no equipamento iniciou-se estes experimentos em condições semelhantes às do Experimento 3. No experimento 4, após o inóculo em biorreator de fibra oca realizado após 48 horas de cultivo, o experimento durou 192 horas, porém devido a complicações com as mangueiras da porta de entrada do espaço extracapilar não foi possível dar continuidade ao experimento. De forma geral os resultados apresentados na Figura 33 e 34 e tabelas B5 e B6 (item 8.2) mostram um crescimento uniforme no biorreator de fibra oca com uma velocidade específica de crescimento de (μ) entre 72 e 168 horas de $0,0063 \text{ h}^{-1}$, valor que pode ser considerado baixo possivelmente devido ao efeito do

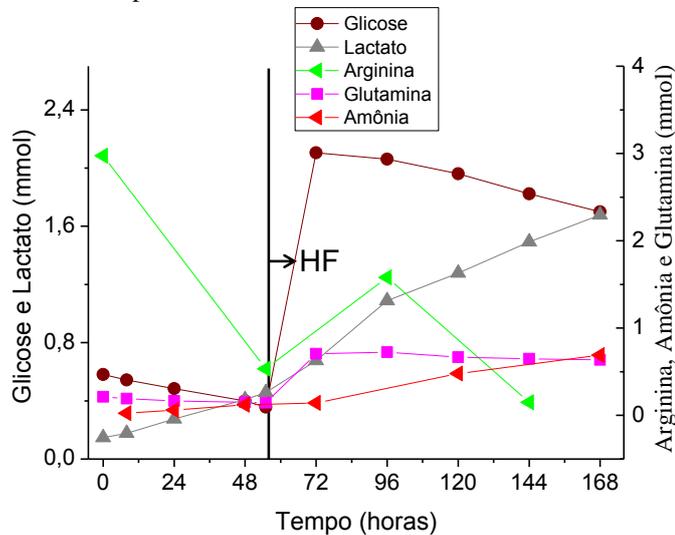
pH que durante grande parte do experimento atingiu valores acima de 7,5. Este problema com pH foi gerado devido ao sistema de cultivo não permitir a entrada de CO₂ da incubadora no meio de cultura, que em ação com o tampão bicarbonato de sódio iria reduzir o valor do pH.

Figura 33 - Resultados obtidos no Experimento 4 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 48 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas durante o cultivo em biorreator de fibra oca foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4. 13. O pH foi determinado com eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca.



(Acervo pessoal)

Figura 34 – Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 4. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL.

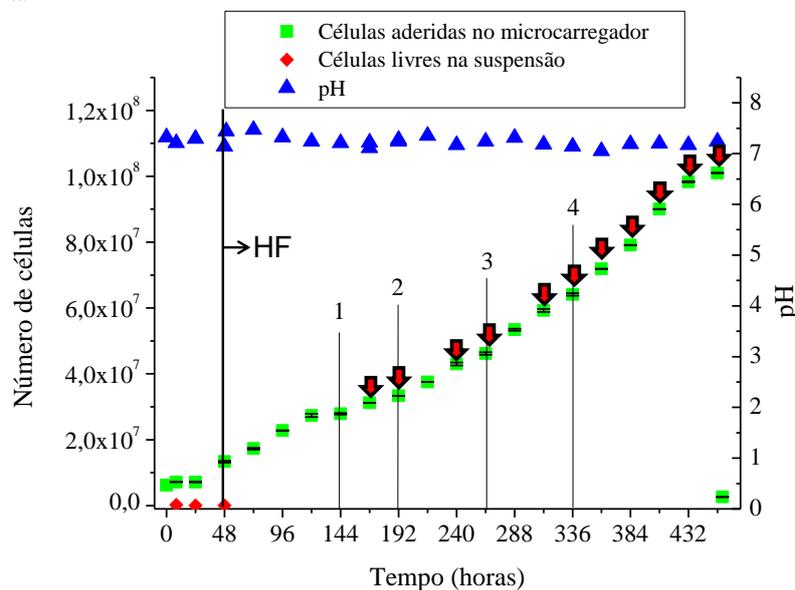


(Acervo pessoal)

No experimento 5 foi reduzido o pH inicial no cultivo em biorreator de fibra oca que iniciou após 48 horas de cultivo. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 35 e 36 e tabelas B7 e B8 (item 8.2). Foram realizadas trocas de um quarto do meio de cultura motivadas pela necessidade da manutenção do pH na faixa ótima das MSCs, entre 7,2 a 7,4.

No intervalo de 48 à 192 horas o valor da taxa específica de crescimento foi de $0,0069 \text{ h}^{-1}$ que pode ser considerado alto para este experimento, possivelmente devido ao não esgotamento de nutrientes. Depois de 192 horas de cultivo o valor de μ foi menor por causa do esgotamento da arginina. A partir deste tempo os dados de números de células calculados através do valor de $Y_{x/s}$ não são mais confiáveis porque possivelmente houve morte celular provocada pela depleção da arginina. A queda muito lenta da concentração de glicose é um indício de que a quantidade de células no biorreator estacionou.

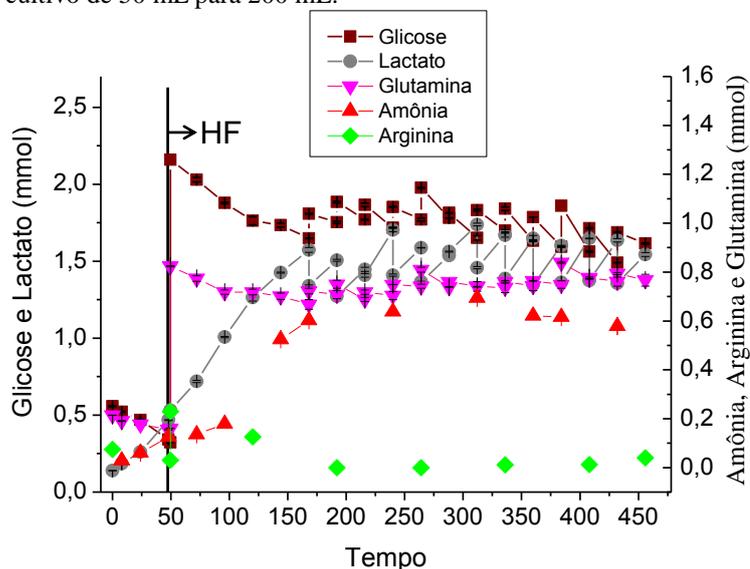
Figura 35 - Resultados obtidos no Experimento 5 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 48 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. A rotação do rolete da bomba foi variado ao longo do experimento (1 = de 15 para 30 rpm; 2 = de 30 para 50 rpm; 3 = de 50 para 70 rpm e 4 = de 70 para 85 rpm). Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C . O número de células aderidas durante o cultivo em biorreator de fibra oca foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4. 13. O pH foi determinado com eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. As setas vermelhas indicam a troca de 25% do meio de cultura.



(Acervo pessoal)

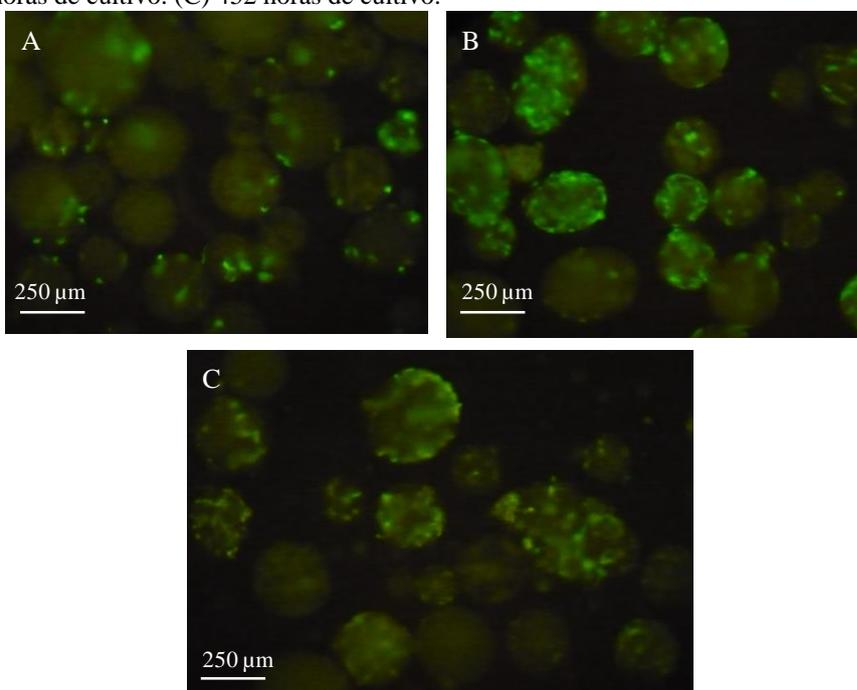
Após 440 horas de cultivo houve uma interrupção no fornecimento de energia elétrica que ocasionou o desligamento da bomba peristáltica. Este fato só foi observado após várias horas do ocorrido, e a falta de fluxo de meio de cultura durante este período pode também ter ocasionado uma morte celular devido a queda drástica de pH e falta de nutrientes.

Figura 36 - Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 5. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra oca, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL.



(Acervo pessoal)

Figura 37 - Fotos dos microcarregadores com células ativas expressando GFP do experimento 5. (A) 8 horas de cultivo. (B) 48 horas de cultivo. (C) 452 horas de cultivo.



(Acervo pessoal)

Com os resultados obtidos nestes experimentos foi possível identificar algumas deficiências de funcionamento do equipamento e definidas algumas ações para obter melhores

resultados nos experimentos seguintes como:

a) Diminuição da duração do experimento em frasco spinner, devido ao fato conhecido em outros trabalhos precedentes de que os microcarregadores com células começam a formar aglomerados com 24 horas neste sistema de cultivo (MIZUKAMI, 2011; SANCHES, 2010). A formação de aglomerados tem como efeito negativo a limitação do crescimento celular como consequência da limitação do transporte de nutrientes para o interior dos mesmos.

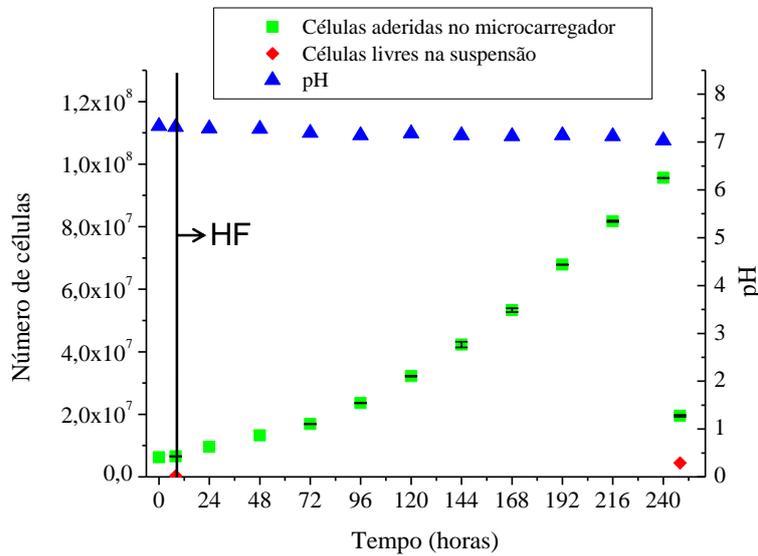
b) Melhoria da distribuição de células na fase de adesão com agitação intermitente. Uma melhor distribuição de células irá permitir uma fase de crescimento mais eficiente, evitando a presença de microcarregadores com quantidades diferentes de células como mostrado na Figura 37.

5. 4. 2 Experimento 6 e 7

Como foi destacado nas fotos do experimento 5, nos estágios avançados dos cultivos foram detectados microcarregadores sem células na sua superfície. Esta situação pode ser o reflexo de morte celular ou de uma distribuição não uniforme destes quando colocados em contato com as células na fase de adesão em frasco spinner. Se o spinner utilizado tiver uma área pequena no fundo, os microcarregadores, ao sedimentarem, vão formar várias camadas e só aqueles situados na camada superior vão entrar em contato com as células, restando vários sem células aderidas na sua superfície (PESHTWA; WONG; HU, 1999). Nestes experimentos foram usados frascos spinner de 500 mL na etapa de preparo de inóculo para proporcionar uma maior área para a distribuição de células nos microcarregadores e a fase de cultivo em frasco spinner foi reduzida para 8 horas.

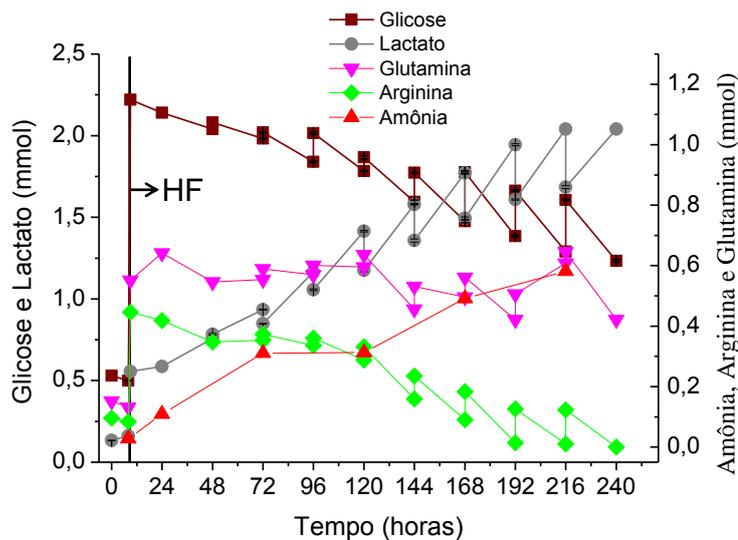
De forma geral o experimento 6 foi realizado com sucesso já que o cultivo foi conduzido sem grandes problemas até as 192 horas quando a concentração de arginina atingiu valores próximos de zero, os resultados estão apresentados nas Figuras 38 e 39 e tabelas B9 e B10 (item 8.2). As melhorias feitas para ter um controle do pH, da oxigenação (que iniciou em 70% e sendo mantida em 90% após 2 dias de cultivo) e estabilidade do sistema como um todo se refletiram na qualidade obtida dos resultados de crescimento. A velocidade específica de crescimento (μ) do experimento entre 24 e 240 horas foi de $0,0107 \text{ h}^{-1}$.

Figura 38 - Resultados obtidos no Experimento 6 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 8 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher-S. Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37°C. O número de células aderidas durante o cultivo em biorreator de fibra oca foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4. 13. O pH foi determinado com eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca.



(Acervo pessoal)

Figura 39 - Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 6. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalizador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL.



(Acervo pessoal)

Após o inóculo em biorreator de fibra oca o experimento durou 240 horas, sendo realizada a troca de um quarto do meio diariamente após 72 horas de cultivo, visando a

manutenção do pH. Com posterior análise de aminoácidos em CLAE apresentado na Figura 39 foi possível observar que a partir das 192 horas de cultivo o nível de arginina atingiu valores próximos de zero. O número de células obtido pela metodologia do MTT com 248 horas de cultivo foi de $1,95 \times 10^7$ e o número de células recuperadas de $1,6 \times 10^7$ pela dissociação com enzima TrypLE 10X em 15 minutos. Este valor abaixo do estimado sugere que deve ter ocorrido morte celular, que não é contabilizada pela metodologia da estimativa com $Y_{x/s}$. Apesar dos problemas ocorridos, o crescimento celular mostrou-se relativamente alto até as 168 horas (durante o crescimento exponencial) com valor de μ de $0,012 \text{ h}^{-1}$. A concentração máxima de células estimada neste tempo foi de $5,33 \times 10^7$, que representa um fator de expansão de 8,53 vezes. Um esquema comparativo entre o crescimento estimado, o número de células final obtido e o esgotamento da arginina está representado na Figura 40.

Duas observações importantes adicionais a serem feitas neste experimento através da Figura 40 são:

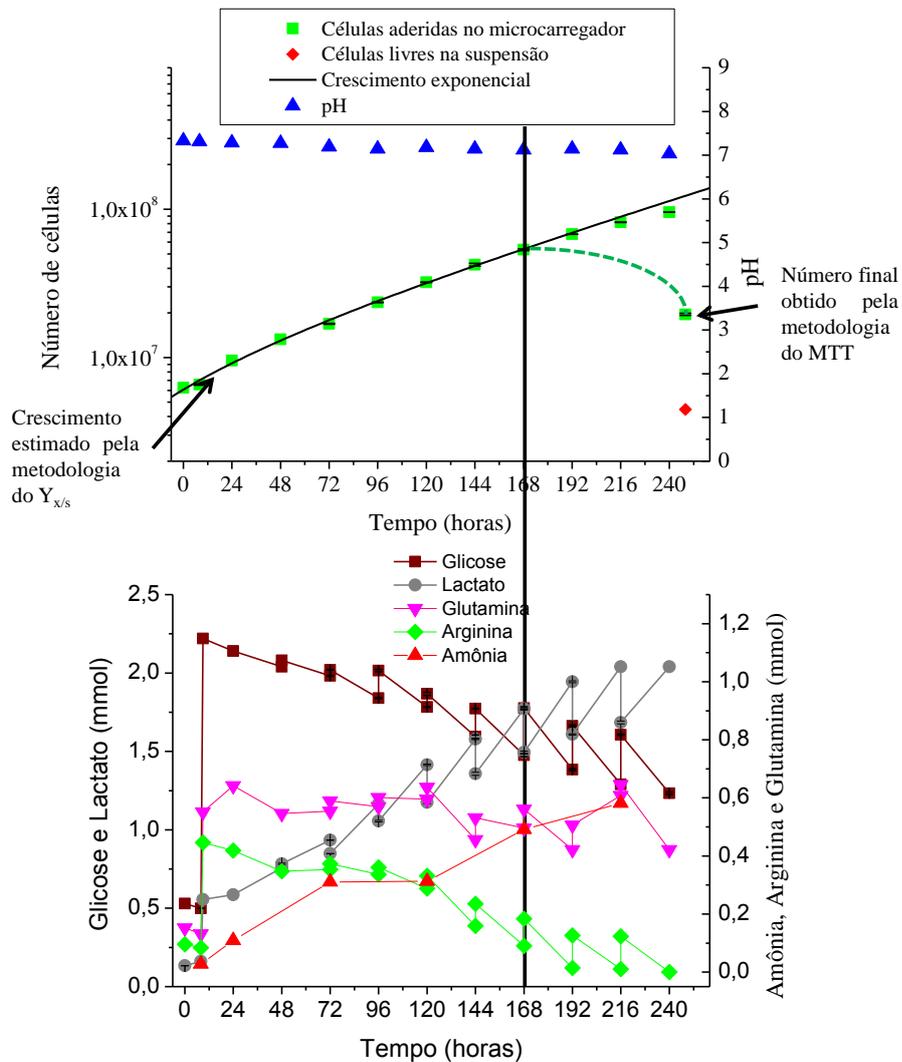
1) A distribuição de células nos microcarregadores ao final das 240 horas de cultivo foi mais aleatória não havendo muitos microcarregadores sem células como em experimentos anteriores.

2) Como se pode observar, os microcarregadores não formaram agregados como os que se formam normalmente em cultivos em spinner em suspensão agitada.

Estas características da técnica de cultivo em biorreator de fibra oca são de crucial importância para o desenvolvimento de uma metodologia eficaz de expansão de MSCs.

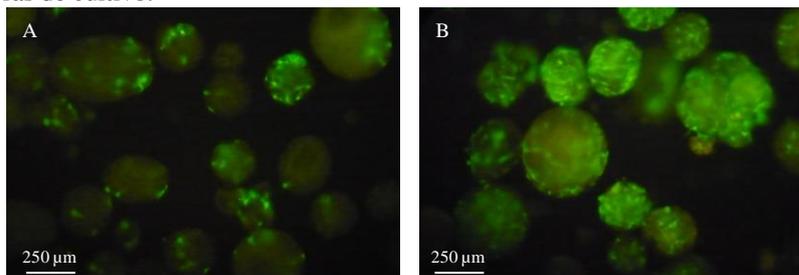
No experimento 7 foram utilizadas as mesmas condições do experimento 6, com exceção da concentração de CaCl_2 usada no gel de inoculação que alterou de 4,5 para 4,25 mM. Os resultados estão representados nas Figura 42 e 43 e tabelas B11 e B12 (item 8.2). O experimento durou 124 horas. Após 96 horas de cultivo ocorreu um vazamento no sistema em uma das conexões entre mangueiras. Devido ao rompimento de uma das travas usadas, ocasionando o esvaziamento do frasco com meio de cultivo e conseqüentemente falta de alimentação de nutrientes no espaço extracapilar, o experimento foi encerrado. Após o cultivo em biorreator de fibra oca o número de células obtido foi de $1,62 \times 10^6$. O valor de μ neste experimento entre 24 e 120 horas foi de $0,0153 \text{ h}^{-1}$ e o fator de expansão de 5,35 vezes. Apesar dos problemas, o cultivo ocorreu de forma similar ao experimento 6, reforçando assim a confiabilidade dos resultados obtidos.

Figura 40 – Comparação entre número de células estimados pelo consumo de glicose em escala logarítmica e quantidade de nutrientes e metabólitos do experimento 6. A curva de crescimento exponencial foi calculada com base nos números estimados de células até 168 horas de cultivo. Pode-se observar que no momento que a arginina atinge valores baixos no meio (indicado pela reta vertical em $t = 168$ horas), o crescimento estimado começa a se afastar da curva exponencial, indicando que na realidade o cultivo entrou em um breve fase estacionária e logo em seguida entrou na fase de morte celular, como é indicado pela seta verde pontilhada, até atingir o valor final de células retiradas do biorreator, que foi obtido pela metodologia do MTT.



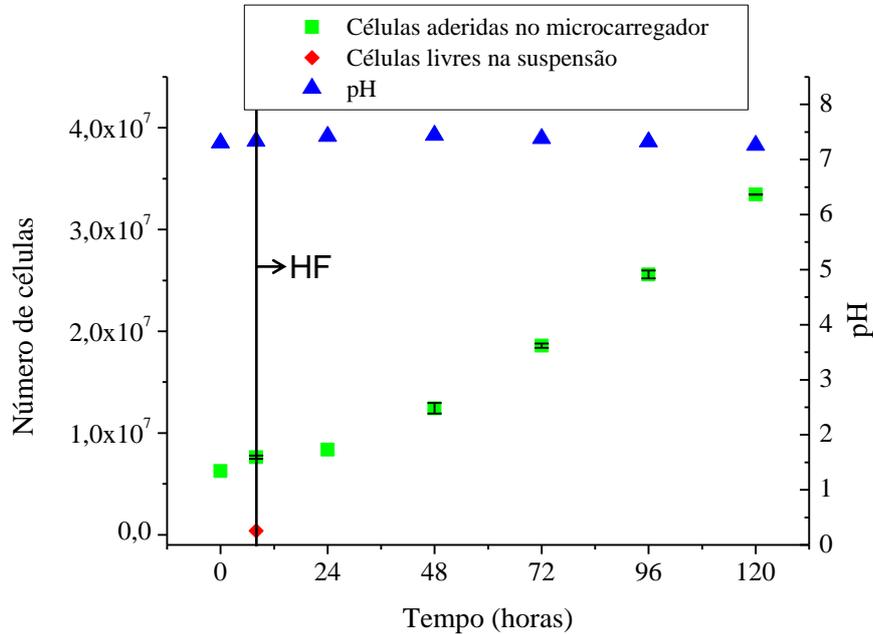
(Acervo pessoal)

Figura 41 - Fotos dos microcarregadores com células ativas expressando GFP do experimento 6. (A) 8 horas de cultivo. (B) 240 horas de cultivo.



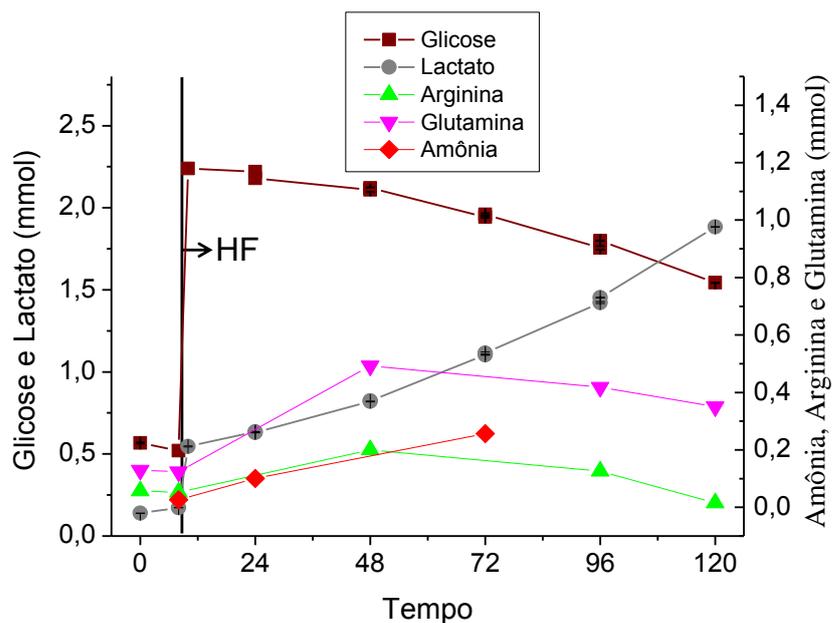
(Acervo pessoal)

Figura 42 - Resultados obtidos no Experimento 7 com a linhagem hMSC-TERT com inóculo preparado no intervalo de 0 à 8 horas em frasco spinner com adesão ao microcarregador Cultispher S. Nos dois cultivos utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino na temperatura de 37° C. O número de células aderidas foi estimado através do $Y_{x/gli}$ como descrito no item 4.13. O pH foi determinado com eletrodo padrão. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca.



(Acervo pessoal)

Figura 43 - Quantidade de nutrientes (glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato e amônia) mais importantes no cultivo da linhagem hMSC-TERT do Experimento 7. Os aminoácidos mais importantes foram selecionados seguindo o critério de ter um consumo maior que 50% do valor inicial no cultivo. A sigla HF marca o início da fase de cultivo em biorreator de fibra oca. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalizador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12). A sigla HF marca o início do cultivo em biorreator de fibra, caracterizado também pelo aumento do volume de meio de cultivo de 50 mL para 200 mL.



(Acervo pessoal)

5. 5 Resumo dos dados obtidos

De maneira geral, com os resultados obtidos durante os cultivos e posteriores análises de aminoácidos e amônia é possível analisar dois pontos importantes que podem ter exercido uma grande influência nas baixas velocidades de crescimento obtidas nos cultivos realizados (em comparação com o cultivo estático):

1 - Valores baixos de arginina em todos os experimentos realizados, como pode ser verificado nas figuras apresentadas

2 -Alta concentração de amônia, um conhecido inibidor de crescimento celular.

3.- Baixa relação de células inoculadas/volume de meio de cultura

A arginina é um aminoácido semi-essencial envolvido em uma variedade de processos fisiológicos, é um precursor necessário para a biossíntese de proteínas, creatina, poliaminas, L-prolina e óxido nítrico e serve como um intermediário no ciclo da uréia (WU; MORRIS, 1998). Mesmo podendo ser obtida por síntese endógena, a maioria das células depende do seu transporte extracelular (DURANTE *et al.*, 2001). Não há relatos sobre o estudo da sua importância especificamente para as MSC, porém provavelmente a sua importância é devido à formação do componente essencial da matriz, a L-prolina, e outras moléculas reguladoras de crescimento, afetando a sua capacidade de adesão e a sua velocidade de crescimento (SIASOS *et al.*, 2007; THEILMEIER *et al.*, 1997).

Enquanto que as células consomem glicose e glutamina para produzir energia, elas produzem dois metabólitos tóxicos: lactato e amônia, os quais podem inibir o crescimento celular (HASSELL; GLEAVE; BUTLER, 1996). Parte do efeito tóxico de lactato e amônia podem ser resultado da perturbação de pH dos gradientes eletroquímicos afetando todo o transporte de membrana (SCHNEIDER; MARISON; VON STOCKAR, 1996; DEAN; JESSUP; ROBERTS, 1984). Acúmulo excessivo de lactato pode reduzir o pH do meio, subsequentemente inibindo o crescimento celular (SCHNEIDER; MARISON; VON STOCKAR, 1996). O amônio não ionizado podem difundir prontamente para a membrana plasmática e organelas da membrana interior causando o aumento do pH de compartimentos intracelulares ácidos (SCHNEIDER; MARISON; VON STOCKAR, 1996). Os valores inibitórios encontrados para MSC humanas foram de 35,4 mM para lactato e 2,4 mM para amônia (SCHOP *et al.*, 2009).

Nos experimentos conduzidos no biorreator de fibra oca, a razão de células

inoculadas com relação ao volume de meio de cultura é quatro vezes menor que nos cultivos em placas de poços e em frasco spinner. Nestas condições os fatores estimulantes do crescimento liberados pelas células ficam mais diluídos e, portanto, o crescimento celular é menos estimulado. Uma forma de contornar este problema seria aumentar a quantidade de células inoculadas no biorreator ou diminuir a quantidade de meio de cultivo utilizado, de tal forma que a razão fique no mesmo valor do utilizado nos outros sistemas de cultivo

Tendo em vista os valores obtidos de concentração de arginina (próximos de 0) e de amônia (próximos de 0,7 mmol, ou seja, 3,5 mM no volume de meio utilizado) pode se prever que metodologias de renovação do meio de cultivo mais frequentes e com maior volume de troca provavelmente resultaram em valores de crescimento celulares maiores. Um resumo dos resultados obtidos pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo dos experimentos realizados.

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7
Equipamentos	Placa de poços	FS ^A	FS ^A	FS ^A /HF ^B			
μ (hora⁻¹)	0,0229	0,0061	0,0185	0,0063	0,0046	0,0107	0,0153
Número inicial de células ($\times 10^6$)	0,02	6,25	6,25	6,25 (9,99) ^C	6,25 (12,3) ^C	6,25 (6,58) ^C	6,25 (7,61) ^C
Número final de células ($\times 10^6$)	0,218	18,9	20,9	40,9	101,8	95,6	33,4
Fator de expansão total	10,9	3,03	3,35	(5,31) ^D	(16,16) ^D	(15,3) ^D	(5,35) ^D
Fator de expansão estimado no cultivo na fase HF^B	-	-	-	4,09	8,21	14,53	4,39
Duração (horas)	120	72	48	168	456	240	120

^A = Frasco spinner, ^B = Biorreator de fibra oca, ^C = Valores em parêntesis são referentes ao número de células inoculadas no biorreator de fibra oca, ^D = Valor em parêntesis se refere a valores estimados pela metodologia do $Y_{x/gli}$ (item 4. 13).

Uma comparação dos resultados obtidos no experimento 6 com dados da literatura podem ser observados na Tabela 3. A metodologia atual apresenta certas dificuldades, porém um alto potencial em comparação com os dados relatados na literatura, levando em consideração que o presente estudo e os trabalhos anteriores realizados no LATECC utilizaram uma linhagem imortalizada ao invés de células de doadores, que apresentam uma variabilidade de comportamento natural como foi citado na revisão

bibliográfica, afetando assim nos resultados obtidos nestes estudos. Podemos o valor satisfatório de expansão estimado tanto em valor total quanto ao valor pelo tempo necessário para obtê-lo. A escolha do experimento 6 como objeto de comparação se deve ao fato dele ser um dos maiores fatores de expansão obtidos e também ter tido um relativo baixo tempo de cultivo, além do alto nível de recuperação celular obtido (82%), para os próximos cultivos em trabalhos futuros provavelmente deverá ser utilizada uma metodologia semelhante ao experimento 6 aliada com uma renovação mais frequente do meio para evitar um esgotamento de arginina e alta concentração de amônia.

Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos no experimentos 6 em comparação com relatos encontrados na literatura e trabalhos anteriores do LATECC com cultivos com MSCs.

	6	Ferrari <i>et al.</i> , 2012	Nold <i>et al.</i> , 2013 ^A	Eibes <i>et al.</i> , 2010	Sanches, 2010	Mizukami, 2011
Tipo de Biorreator	FS ^B /HF ^C	FS ^B	HF ^C	FS ^B	FS ^B	FS ^B /HF ^C
Tipo de micro-carregador	Cultispher [®] -S	Cytodex [®] -1		Cultispher [®] -S	Cultispher [®] -S	Pronectin [®] -F
Número inicial de células (× 10⁶)	6,25	6	4,5	2,6	6,25	6,25
Número final de células (× 10⁶)	95,6	70	46	21	60,6	70
Fator de expansão total	(15,3) ^D	11,7	10,22	8,4	9,7	(11,2) ^D
Duração (h)	240	192	264	192	360	190
Fator de expansão/duração (h⁻¹)	0,064	0,061	0,039	0,044	0,027	0,059

^A = Média dos quatro cultivos relatados com células de diferentes doadores, ^B = Frasco spinner, ^C = Biorreator de fibra oca, ^D = Valores estimados pela metodologia do $Y_{x/s}$ (item 4. 13).

6 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos foi possível listar as seguintes conclusões:

➤ 1 - O cultivo da linhagem hMSC-TERT em um biorreator de fibra oca com circulação de meio de cultura oxigenado pelo espaço intracapilar e as células aderidas ao microcarregador Cultispher-S[®] no espaço extracapilar é possível.

➤ 2 - A simulação matemática da transferência e consumo de oxigênio como substrato mais limitante do cultivo de MSCs no biorreator de fibra oca permitiu a obtenção de um espaçamento de 2 mm, que possibilitou um comportamento de crescimento exponencial, principalmente nos experimentos 6 e 7, comprovando a ausência de limitação por oxigênio, que impediria esse tipo de crescimento.

➤ 3 - O cultivo da linhagem hMSC-TERT aderida ao microcarregador Cultispher-S[®] suspensa e imobilizada em um gel de alginato no espaço extracapilar no biorreator de fibra oca permitiu bom crescimento celular sem formação de aglomerados.

➤ 4 - A utilização do conceito do fator de rendimento $Y_{x/s}$ sob a hipótese de valor constante permitiu estimar de forma simples a concentração de células no biorreator de fibra oca, sendo necessário ainda a sua validação com a realização de mais cultivos sem fatores limitantes, como a baixa concentração de arginina, excesso de amônia e a baixa concentração celular inicial.

➤ 5 - A expansão da linhagem hMSC-TERT no biorreator de fibra oca possibilitou a obtenção de fatores de expansão antes da falta de nutrientes de até 8,5 vezes em 168 horas, sem a formação de aglomerados.

➤ 6 - A utilização do meio de cultura α -MEM suplementado mostrou um conteúdo estequiometricamente limitante do aminoácido semi-essencial arginina para o cultivo da linhagem hMSC-TERT.

7 REFERÊNCIAS

BAKSH, D.; DAVIES, J. E.; ZANDSTRA, P. W. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 8, p. 723-732, 2003.

BAKSH, D.; DAVIES, J. E.; ZANDSTRA, P. W. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3012-3019, 2005.

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, n. 6, p. 707-715, 2000.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 4, 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 of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 31, p. 13724-13729, 2010.

BIEBACK, K.; KERN, S.; KLÜTER, H.; EICHLER, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 22, n. 4 p. 625-634, 2004.

CADWELL, J. J. S. New developments in hollow fiber cell culture. **American Biotechnology Laboratory**, July, p. 1-5, 2004.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I. A. G.; HUMAR, S.; BENNETT, P. R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402. 2001

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

CHEN, S. L.; FANG, W. W.; YE, F.; LIU, Y. H.; QIAN, J.; SHAN, S. J.; ZHANG, J. J.; CHUNHUA, R. Z.; LIAO, L. M.; LIN, S. L.; SUN, J. P. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction, **The American Journal of Cardiology**, v. 94, n. 1, 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**, v. 24, n. 9, p. 2052-2059, 2006.

CHOW, D. C.; WENNING, L. A.; MILLER, W. M.; PAPOUTSAKIS, E. T. Modeling pO₂

- distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's Model. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 2, p. 675-684, 2001.
- 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**, v. 305, n. 1, p. 8-20, 2011.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.
- DEAN, R.T.; JESSUP, W.; ROBERTS, C.R. Effect of exogenous amines on mammalian cells, with particular reference to membrane flow. **The Biochemical Journal**, v. 217, n. 1, p. 27-40. 1984.
- DELAUNAY, C.; DARQUY, S.; HONIGER, J.; CAPRON, F.; ROUAULT, C.; REACH, G. Glucose-insulin kinetics of a bioartificial pancreas made of an AN69 hydrogel hollow fiber containing porcine islets and implanted in diabetic mice. **Artificial Organs**, v. 22, n. 4, p. 291-299, 1998.
- 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. 25, n. 10, p. 2575-2582, 2007.
- DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, v. 414, n. 1, p. 92-97. 2001.
- DOS SANTOS, F.; ANDRADE, P. Z.; BOURA, J. S.; ABECASIS, M. M.; SILVA, C. L.; 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, n. 1, p.27-35, 2010.
- DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**, New York: John Wiley & Sons, 1998. 352 p.
- DURANTE, W.; LIAO, L.; REYNA, S. V.; PEYTON, K. J.; SCHAFER, A. I. Transforming growth factor-beta (1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis. **Circulation**, v. 103, n. 8, p. 1121-1127, 2001.
- EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, n. 3168, p. 501-504, 1955.
- EIBES, G.; DOS SANTOS, F.; ANDRADE, P. Z.; BOURA, J. S.; ABECASIS, M. M. A.; DA SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 146, n. 4, p. 194-197, 2010.
- FERRARI, C.; BALANDRAS, F.; GUEDON, E.; OLMOS, E.; CHEVALOT, I.; MARC, A. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers.

Biotechnology Progress, v. 28, n. 3, p. 780-787, 2012.

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**, v. 23, n. 1, 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 Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FRITH, J. E.; THOMSON, B.; GENEVER, P. G. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 4, p. 735-749, 2010.

GODARA, P.; NORDON, R. E.; MCFARLAND, C. D. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 4, p. 408-420, 2008a.

GODARA, P.; NORDON, R. E.; MCFARLAND, C. D. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 4, p. 397-407, 2008b.

GRANET, C.; LAROCHE, N.; VICO, L.; LAFAGE-PROUST, M. Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 36, n. 4, p. 513-519, 1998.

HASSELL, T.; GLEAVE, S.; BUTLER, M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 29-51. 1991.

HOFMANN, S.; HAGENMULLER, H.; KOCH, A. M.; MULLER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D. L.; MERKLEA, H. P.; MEINEL, L. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 1152-1162, 2007.

HUSSAIN, A.; ZIMMERMAN, C. A.; BOOSE, J. A.; FROELICH, J.; RICHARDSON, A.; HOROWITZ, R. S.; COLLINS, M. T.; LASH, R. W. Large scale synthesis of recombinant human thyrotropin using methotrexate amplification: chromatographic, immunological, and biological characterization. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 3, p. 1184-1188, 1996.

KEHOE, D. E.; JING, D.; LOCK, L. T.; TZANAKAKIS, E. S. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. **Tissue Engineering: Part A**, v. 16, n. 2, p. 405-421, 2010.

KIM, H. J.; KIM, U. J.; LEISK, G. G.; BAYAN, C.; GEORGAKOUDI, I.; KAPLAN, D. L. Bone regeneration on macroporous aqueous-derived silk 3-D scaffolds. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 5, p. 635-655, 2007.

KING, J. A.; MILLER, W. M. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation, **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 394-398, 2007.

- KNAZEK, R. A.; GULLINO, P. M.; KOHLER, P. O.; DEDRICK, R. L. Cell culture on artificial capillaries: An approach to tissue growth in vitro. **Science**, v. 178, n. 4056, p.65-66, 1972.
- KOLLER, M. R.; EMERSON, S. G.; PALSSON, B. O. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. **Blood**, v. 82, n. 2, p. 378-384, 1993.
- LAZARUS, H. M.; KOC, O. N.; DEVINE, S. M.; CURTIN, P.; MAZIARZ, R. T.; HOLLAND, H. K.; SHPALL, E. J.; MCCARTHY, P.; ATKINSON, K.; COPPER, B. W.; GERSON, S. L.; LAUGHLIN, M. J.; LOBERIZA-JR, F. R.; MOSELEY, A. B.; BACIGALUPO, A. Cotransplantation of HLA-Identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 11, n. 5, p. 389-398, 2005.
- LANGE, C.; CAKIROGLU, F.; SPIESS, A. N.; CAPALLO-OBERMANN, 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, n. 1, p. 18-26, 2007.
- LEGALLAIS, C.; DAVID, B.; DORÉ, E. Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. **Journal of Membrane Science**, v. 181, n. 1, p. 81-95, 2001.
- LIU, J. J.; TSAI, T. F.; WU, Y. J.; PANG, V. F.; HSIEH, A.; HSIEH, J. H.; CHANG, T. H. Long term and large-scale cultivation of human hepatoma Hep G2 cells in hollow fiber bioreactor. **Cytotechnology**, v. 5, n. 2, p. 129-139, 1991.
- MAROLT, D.; AUGST, A.; 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, n. 36, p. 6138-6149, 2006.
- MEINEL, L.; KARAGEORGIU, V.; FAJARDO, R.; SNYDER, B.; SHINDE-PATIL, V.; ZICHLER, L.; KAPLAN, D.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 112-122, 2004.
- MEISSNER, P. SCHRÖDER, B. HERFURTH, C. BISELLI, M. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. **Cytotechnology**, v. 30, n. 1-3, p. 227-234. 1999.
- MENDONÇA, M. L. Dissertação em andamento (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 6, p. 507-520, 2001.
- MIZUKAMI, A. **Expansão in vitro de células-tronco mesenquimais cultivadas em biorreator de fibra oca**. 2011. 145f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2011.

- MIZUNO, N.; SHIBA, H.; OZEKI, Y.; MOURI, Y.; NIITANI, M.; INUI, T.; HAYASHI, H.; SUZUKI, K.; TANAKA, S.; KAWAGUCHI, H.; KURIHARA, H. Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. **Cell Biology International**, v. 30, n. 6, p. 521-524, 2006.
- MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1161-1166, 2000.
- MYGIND, T.; STIEHLER, M.; BAATRUP, A.; LI, H.; ZOU, X.; FLYVBJERG, A.; KASSEM, M.; BÜNGER, C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 1036-1047, 2007
- NACHMAN, M. Kinetic aspects of membrane-based immunoaffinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 597, n. 1-2, p. 167-172, 1992.
- NIELSEN, L. K. Bioreactors for hematopoietic cell culture. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 1, p. 129-152, 1999.
- NILSSON, K.; BUZSAKY, F.; MOSBACH, K. Growth of anchorage-dependent cells on macroporous microcarriers. **Nature Biotechnology**, v. 4, n. 11, p. 989-990, 1986.
- NOLD, P.; BRENDEL, C.; NEUBAUER, A.; BEIN, G.; HACKSTEIN, H. Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 1, p. 325-330, 2013.
- PATTAPPA, G.; HEYWOOD, H. K.; DE BRUIJN, J. D.; LEE, D. A. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 10, p. 2562-2570, 2011.
- PENG, C. A.; PALSSON, B. O. Cell growth and differentiation on feeder layers is predicted to be influenced by bioreactor geometry. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 5, p. 479-492, 1996.
- PENG, L.; LI, H.; GU, L.; PENG, X. M.; HUANG, Y. S.; GAO, Z. L. Comparison of biological characteristics of marrow mesenchymal stem cells in hepatitis B patients and normal adults. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 11, p. 1743-1746, 2007.
- PESHTWA, M. V.; WONG, K.; HU, W. -S. Microcarrier culture. In: DREW, S. W.; FLICKINGER, M. C. **Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation**. New York: John Wiley & Sons, 1999. p. 1781-1785.
- PLACZEK, M. R.; CHUNG I. M.; MACEDO, H. M.; ISMAIL, S.; BLANCO, T. M.; LIM, M.; CHA, J. M.; FAUZI, I.; KANG, Y.; YEO, D. C. L.; MA, C. Y. J.; POLAK, J. M.; PANOSKALTIS, N.; MANTALARIS, A. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, n. 32, p. 209-232, 2009.
- PRILLIMAN, K.; LINDSEY, M.; ZUO, Y.; JACKSON, K. W.; ZHANG, Y.; HILDEBRAND, W. Large-scale production of class I bound peptides: assigning a signature to HLA-B*1501. **Immunogenetics**, v. 45, n. 6, p. 379-385, 1997.

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, P. E.; EMERY, P.; GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. **International Journal of the Care of the Injured**, v. 38, s. 4, p. 23-24, 2007.

QIU, Q. Q.; DUCHEYNE, P.; AYYASWAMY, P. S. Fabrication, characterization and evaluation of bioceramic hollow microspheres used as microcarriers for 3-D bone tissue formation in rotating bioreactors. **Biomaterials**, v. 20, n. 11, p. 989-1001, 1999.

RATNER, P. L.; CLEARY, M. L.; JAMES, E. Production of "rapid-harvest" Moloney murine leukemia virus by continuous cell culture on synthetic capillaries. **Journal of Virology**, v. 26, n. 2, p. 536-539, 1978.

RINGDEN, O.; UZUNEL, M.; RASMUSSEN, I.; REMBERGER, M.; SUNDBERG, B.; LONNIES, H.; MARSCHALL, H. U.; DLUGOSZ, A.; SZAKOS, A.; HASSAN, Z.; OMAZIC, B.; ASCHAN, J.; BARKHOLT, L.; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. **Transplantation**, v. 81, n. 10, p. 1390-1397, 2006.

RODRIGUES, C. A. V.; FERNANDES, T. G.; DIOGO M. M.; DA SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Stem cell cultivation in bioreactors. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 815-829, 2011.

ROGERS, I.; CASPER, R. F. Umbilical cord blood stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 18, n. 6. P. 893-908, 2004.

SANCHES, S. **Expansão de células-tronco mesenquimais em frasco spinner com microcarregadores**. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SANTOS, E.; HERNÁNDEZ, R. M.; PEDRAZ, J. L.; OLIVE, G. Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: translation from 2D to 3D. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 331-341. 2012.

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, n. 4, p. 291-299, 2009.

SCHNEIDER, M.; MARISON, I.W.; VON STOCKAR, U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. **Journal of Biotechnolgy**, v. 46, n. 3, p. 161-185. 1996.

SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.; BORGART, E.; DE BRUIJN, J. D.; VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 2-3, p. 126-135, 2008.

SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.; VAN RIJN, L. D.; FERNANDES, H.; BLOEM, R. M.; DE BRUIJN, J. D.; VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 8, p. 2653–2663. 2009.

SEEBACH, C.; HENRICH, D.; TEWKSBURY, R.; WILHEIM, K.; MARZI, I. Number and

Proliferative Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells Are Modulated Positively in Multiple Trauma Patients and Negatively in Atrophic Nonunions. **Calcified Tissue International**, v. 80, n. 4, p. 294-300, 2007.

SIASOS, G.; TOUSOULIS, D.; ANTONIADES, C.; STEFANADI, E.; STEFANADIS, C. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis. **International Journal of Cardiology**, v. 116, n. 3, p. 300-308, 2007.

SILVA-JR, H.; BOROJEVIC, R. Cell Therapies and Stem Cells. In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. **Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy**, London: Taylor & Francis, 2008, v. 1, p. 475-488.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 457-478, 2011.

SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. **Cytotechnology**, v. 30, n. 1, p. 149-158, 1999.

SMITH, A. A glossary for stem-cell biology. **Nature**, v. 441, n. 29, p. 1060, 2006.

SONG, K.; YANG, Z.; LIU, T.; ZHI, W.; LI, X.; DENG, L.; CUI, Z.; MA, X. Fabrication and detection of tissueengineered bones with bio-derived scaffolds in a rotating bioreactor. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 65-74, 2006.

SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; SALAGIANNI, M.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 462-471, 2006

STENDERUP, K.; JUSTESEN, J.; CLAUSEN, C.; KASSEM, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, n. 6, p. 919-926, 2003.

THARAKAN, J. P.; GALLAGHER, S. L.; CHAU, P. C. Hollow-fiber bioreactors for mammalian cell culture. In: MIZRAHJ, A. **Advances in biotechnological process**. New York: Allan R. Liss, 1988. p.153-184.

THEILMEIER, G.; CHAN, J. R.; ZALPOUR, C.; ANDERSON, B.; WANG, B.; WOLF, A.; TSAO, P. S.; COOKE, J. P. Adhesiveness of mononuclear cells in hypercholesterolemic humans is normalized by dietary l-arginine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 12, p. 3557-3564. 1997.

THOMAS, R. J.; ANDERSON, D.; CHANDRA, A.; SMITH, N. M.; YOUNG, L. E.; WILLIAMS, D.; DENNING, C. Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1636-1644, 2009.

TIGLI, R. S.; CANNIZARO, C.; GUMUSDERELIOGLU, M.; KAPLAN, D. L. Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 96A, n. 1, p. 21-28, 2011.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual review of biochemistry**, v. 67, n. 67, p.

509-544, 1998.

TURHANI, D.; WATZINGER, E.; WEIßENBOCK, M.; CVIKL, B.; THURNHER, D.; WITTEW, G.; YERIT, K.; EWERS, G. Analysis of cell-seeded 3-dimensional bone constructs manufactured in vitro with hydroxyapatite granules obtained from red algae. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 5, p. 673-681, 2005.

USULUDIN, S. B. M.; CAO, X.; LIM, M. Co-culture of stromal and erythroleukemia cells in a perfused hollow fiber bioreactor system as an in vitro bone marrow model for myeloid leukemia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 1248-1258, 2012.

VAN WEZEL, A. L. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. **Nature**, v. 216, n.5110, p. 64-65, 1967.

VAN WEZEL, A. L. New trends in the preparation of cell substrates for the production of virus vaccines. **Progress in Immunobiological Standardization**, v. 5, n. 5, p.187-192, 1972.

WANG, H. S.; HUNG, S. C.; PENG, S. T.; HUANG, C. C.; WEI, H. M.; GUO, Y. J.; FU, Y. J.; LAI, M. C.; CHENA, C. C. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1330-1337, 2004

WEBER, C.; FREIMARK, D. PÖRTNER, R.; PINO-GRACE, P.; POHL, S.; WALLRAPP, C.; GEIGLE, P.; CZERMAK, P. Expansion of human mesenchymal stem cells in a fixed-bed bioreactor system based on non-porous glass carrier-part A: inoculation, cultivation, and cell harvest procedures. **International Journal of Artificial Organs**, v. 33, n. 8, p. 512-525. 2010.

WHITFORD, W. G.; CADWELL, J. J. S. Interest in hollow-fiber perfusion bioreactors is growing. **BioProcess International**, v. 7, n. 9, p. 54-64, 2009.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 336, n. 1, p. 1-17, 1998.

YANG, Y.; ROSSI, F. M. V.; PUTNINS, E. E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. **Biomaterials**, v. 28, n. 20, p. 3110-3120, 2007.

YAZAKI, P. J.; SHIVELY, L.; CLARK, C.; CHEUNG, C. W.; LE, W.; SZPIKOWSKA, B.; SHIVELY, J. E.; RAUBITSCHKEK, A. A.; WU, A. M. Mammalian expression and hollow fiber bioreactor production of recombinant anti-CEA diabody and minibody for clinical applications. **Journal of Immunological Methods**, v. 253, n. 1-2, p. 195-208, 2001.

YE, H.; CUI, Z. F.; ELLIS, M. J.; MACEDO, H.; MANTALARIS, A. Hollow fiber membrane bioreactor technology for tissue engineering and stem cell therapy. In: DRIOLI, E.; GIORNO, L. **Comprehensive Membrane Science and Engineering**, Oxford: Elsevier, 2010, p. 213-227

YEATTS, A. B.; FISHER, J. P. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 3, p. 337-348, 2011.

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS, K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P. A.; BLACK, A. C. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

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**, v. 159, n. 1, p.110-118, 2009.

ZHANG, Z. Y.; TEOH, S. H.; TEO, E. Y.; CHONG, M. S. K.; SHIN, C. W.; TIEN, F. T.; SHIN, C. W.; TIEN, F. T.; CHOLANI, M. A.; CHAN, J. K. Y. A comparison of bioreactors for culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8684-8695, 2010.

ZHAO, F.; MA, T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: Dynamic cell seeding and construct development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 4, p. 482-493, 2005.

ZHAO, F.; PATHI, P.; GRAYSON, W.; XING, Q.; LOCKE, B. R.; MA, T. Effects of oxygen transport on 3-d human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: experiments and mathematical model. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1269-1280, 2005.

ZVAIFLER, N. J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C. J.; MOSS, J.; BURGER, J. A.; MAINI, R. N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Research & Therapy**, v. 2, n. 6, 2000.

8 APÊNDICES

8.1 A - Perspectivas futuras

Pelos resultados obtidos, foi possível observar a possibilidade de expansão de MSC no biorreator de fibra oca, porém para este método se tornar um alternativa viável será obrigatória a obtenção de valores mais altos de velocidade de crescimento e consequentemente rendimentos maiores de expansão. Para atingir tal objetivo o presente estudo terá continuidade numa tese de doutorado. As hipóteses a serem testadas para aumentar a expansão são as seguintes:

➤ A MSC é conhecida por ser uma linhagem que reside no corpo humano em locais de baixos níveis de oxigenação e possui baixa taxa de respiração, sendo comprovado em estudo que ela possui níveis de expansão maiores na presença de baixos níveis de oxigênio dissolvido (DOS SANTOS *et al.*, 2010). Devido a essas informações encontradas na literatura, será testado o cultivo em taxas menores de oxigenação, porém será necessário se verificar a geração de regiões sem oxigênio por meio de simulação e experimentos para estimar as taxas de respiração da linhagem a ser utilizada.

➤ Uma característica importante do sistema do biorreator de fibra oca é a possibilidade do controle do diâmetro dos poros. Através desse controle o fluxo de entrada de fluidos do espaço intracapilar para o espaço extracapilar e o diâmetro das partículas a serem filtradas é controlado em processos de purificação e tratamento de fluídos. O uso do biorreator de fibra oca no cultivo de células esse diâmetro dos poros permite o controle de quais partículas terão o fluxo permitido por dentro das fibras, sendo essencial que os nutrientes encontrados no meio e os metabólitos produzidos pelas células tenham trânsito livre. Porém na literatura é relatado que existe uma faixa de diâmetro de poros que permite esse livre trânsito e impede o trânsito de proteínas de maior tamanho secretadas pelas células, entre essas proteínas estão fatores de crescimento como interleucina-6 e fator inibidor da leucemia, sendo relatado que possuem tamanho maior que 20 kDa (USULUDIN *et al.*, 2012). Então nas próximas etapas deste estudo serão testados os cultivos em biorreatores com fibras de diâmetro médio de 10 kDa, garantindo a retenção desses importantes fatores próximos as células, aumentando assim a sua velocidade de expansão.

➤ Existe também a possibilidade que a expansão das MSC não atinja níveis satisfatórios devido ao baixo volume de trabalho permitido (de 13 a 14 mL). Porém com relativa facilidade é possível o aumento desse volume, para isto será necessário a obtenção de módulos maiores de filtração ou de material de policarbonato para a confecção dos novos biorreatores.

Assim que o sistema estiver atingindo níveis satisfatórios de expansão, será testada a expansão de linhagens obtidas de doadores coletadas no Hemocentro de Ribeirão Preto do cordão umbilical de recém-nascidos, com o objetivo de obter uma metodologia de expansão de MSCs viáveis para o uso na terapia celular.

8. 2 B – Tabelas de resultados

Tabela B1 - Resumo dos dados obtidos no experimento 1 realizado em triplicata a partir de 24 horas.

Tempo (h)	Média do número de células	Desvio padrão	Média da glicose (mol)	Desvio padrão	Controle*-Glicose (mol)	Média da glutamina (mol)	Desvio padrão	Controle*-Glutamina (mol)
0	2,00E+04		1,19E-05		1,19E-05	4,92E-06		4,92E-06
24	2,42E+04	3,15E+03	1,18E-05	2,08E-07	1,17E-05	4,84E-06	1,36E-07	4,87E-06
48	8,13E+04	1,07E+04	1,11E-05	3,46E-07	1,16E-05	4,42E-06	1,27E-07	4,59E-06
72	1,22E+05	5,05E+03	1,03E-05	4,36E-07	1,20E-05	4,19E-06	1,23E-07	4,41E-06
96	1,72E+05	1,44E+04	9,61E-06	2,08E-07	1,26E-05	3,88E-06	7,21E-08	4,37E-06
120	2,18E+05	2,18E+04	8,82E-06	3,92E-07	1,30E-05	3,58E-06	1,13E-07	4,28E-06

*O termo controle se refere a um cultivo sem células para verificar a alteração na quantidade de substrato ou metabólito.

Tabela B2 - Resumo dos dados obtidos no experimento 1 realizado em triplicata a partir de 24 horas.

Tempo (h)	Média do lactato (mol)	Desvio padrão	Controle*-Lactato (mol)
0	2,96E-06		2,96E-06
24	3,53E-06	6,66E-08	2,93E-06
48	4,39E-06	1,27E-07	2,88E-06
72	5,90E-06	2,84E-07	3,02E-06
96	7,79E-06	1,86E-07	3,21E-06
120	9,78E-06	3,67E-07	3,31E-06

*O termo controle se refere a um cultivo sem células para verificar a alteração na quantidade de substrato não causado pelas células.

Tabela B3 - Resumo dos dados obtidos no experimento 2 e apresentados na figura 30. Células aderidas foram quantificadas pelo metodologia do MTT e livres pela contagem em hemacitômetro. O pH foi medido com eletrodo padrão.

Tempo (h)	Média do número de células aderidas	Desvio padrão	Número de células livres na suspensão	pH
0	6,25E+06		5,00E+05	7,35
8	9,62E+06	0,00E+00	3,26E+05	7,23
24	1,07E+07	9,89E+04	3,26E+05	7,23
48	1,34E+07	1,14E+05	0,00E+00	7,16
72	1,43E+07	5,71E+05	2,83E+05	6,96

Tabela B4 - Resumo dos dados obtidos no experimento 3 e apresentados na figura 31. Células aderidas foram quantificadas pelo metodologia do MTT e livres pela contagem em hemacitômetro. O pH foi medido com eletrodo padrão.

Tempo (h)	Média do número de células aderidas	Desvio padrão	Número de células livres na suspensão	pH
0	6,25E+06		5,00E+05	7,29
8	9,96E+06	4,12E+04	3,26E+05	7,25
24	1,70E+07	1,89E+05	0,00E+00	7,08/7,28*
48	2,09E+07	2,06E+05	2,83E+05	6,86

*Antes e depois da troca de 50% do meio de cultura

Tabela B5 - Resumo dos dados obtidos no experimento 4 e apresentados na figura 32. Células aderidas foram quantificadas pelo metodologia do MTT na fase spinner, estimativa por $Y_{x/s}$ na fase fibra oca e células livres pela contagem em hemacitômetro. O pH foi medido com eletrodo padrão.

Tempo (h)	Média do número de células aderidas	Desvio padrão	Número de células livres na suspensão	pH
0	6,25E+06	--		7,32
8	8,83E+06	1,06E+05	0,00E+00	7,33
24	7,93E+06	9,54E+04	0,00E+00	7,29
48	1,08E+07	5,74E+04	0,00E+00	7,18
72	1,81E+07	8,79E+05		7,73
96	1,97E+07	8,79E+05		7,66
120	2,35E+07	8,79E+05		7,56
144	2,86E+07	1,06E+06		7,44
168	3,32E+07	5,86E+04		7,38

Tabela B6 - Resumo dos dados obtidos no experimento 4 e apresentados na figura 33. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalizador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12).

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Lactato (mmol)	Glutamina (mmol)	Arginina (mmol)	Amônia (mmol)
0	0,58	0,15	0,21	0,08	
8	0,54	0,18	0,19		0,03
24	0,48	0,28	0,17		0,06
48	0,40	0,41	0,15		0,12
55	0,36	0,46	0,15	0,02	
72	2,11	0,68	0,71		0,14
96	2,06	1,09	0,73	0,18	
120	1,96	1,28	0,67		0,48
144	1,82	1,49	0,65	0,02	
168	1,70	1,68	0,64		0,69

Tabela B7 - Resumo dos dados obtidos no experimento 5 e apresentados na figura 34. Células aderidas foram quantificadas pelo metodologia do MTT na fase spinner, estimativa por $Y_{x/s}$ na fase fibra oca e células livres pela contagem em hemacitômetro. O pH foi medido com eletrodo padrão.

Tempo (h)	Média do número de células aderidas	Desvio padrão	Número de células livres na suspensão	pH
0	6,25E+06	--		7,32
8	7,16E+06	5,58E+04	1,88E+05	7,21
24	7,16E+06	1,16E+05	6,51E+04	7,29
48	1,33E+07	2,42E+05	6,78E+04	7,14
72	1,73E+07	2,62E+05		7,47
96	2,28E+07	7,87E+04		7,32
120	2,74E+07	4,98E+05		7,24
144	2,79E+07	2,36E+05		7,21
168	3,12E+07	2,62E+04		7,11/7,22*
192	3,33E+07	5,25E+04		7,24/7,27*
216	3,75E+07	6,56E+03		7,35
240	4,30E+07	4,66E+05		7,17
264	4,62E+07	3,87E+05		7,24
288	5,34E+07	2,82E+05		7,31
312	5,92E+07	4,39E+05		7,18
336	6,41E+07	4,00E+05		7,14
360	7,19E+07	8,53E+04		7,05
384	7,91E+07	7,21E+04		7,19
408	9,00E+07	6,56E+03		7,2
432	9,83E+07	1,51E+05		7,17
456	1,01E+08	4,59E+04		7,24
460	2,63E+06	4,13E+04		

*Antes e depois da troca de meio.

Tabela B8 - Resumo dos dados obtidos no experimento 5 e apresentados na figura 35. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12).

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Desvio padrão	Lactato (mmol)	Desvio padrão	Glutamina (mmol)	Desvio padrão	Arginina (mmol)	Amônia (mmol)
0	0,56	3,5E-03	0,14	3,5E-04	0,21	3,5E-04	0,07	
8	0,52	3,5E-03	0,18	3,5E-04	0,19	1,8E-03		0,03
24	0,47	4,9E-03	0,26	0,0E+00	0,18	0,0E+00		0,06
48	0,34	7,1E-04	0,47	2,1E-03	0,16	2,1E-03		0,13
50	0,32	3,5E-04	0,53	3,5E-03	0,16	3,5E-04	0,03	
50	2,16	0,0E+00	0,53	2,8E-03	0,82	2,8E-03	0,23	
72	2,03	1,4E-02	0,72	7,1E-03	0,77	1,1E-02		0,14
96	1,88	4,2E-03	1,01	4,2E-03	0,72	8,5E-03		0,18
120	1,76	2,7E-02	1,27	2,4E-02	0,72	1,1E-02	0,13	
144	1,74	1,3E-02	1,43	2,8E-03	0,70	1,3E-02		0,52
168	1,65	1,4E-03	1,57	1,6E-02	0,67	2,0E-02		
168	1,81	2,8E-03	1,34	5,7E-03	0,72	1,1E-02		0,60
192	1,75	7,1E-03	1,51	5,7E-03	0,71	1,7E-02	0,00	
192	1,88	5,3E-03	1,27	4,2E-03	0,75	1,6E-02		
216	1,77	2,8E-03	1,45	1,3E-02	0,69	8,5E-03		
216	1,87	1,1E-02	1,41	1,1E-02	0,72	8,5E-03		
240	1,72	2,8E-03	1,70	1,1E-02	0,70	1,7E-02		0,64
240	1,85	2,1E-03	1,41	6,7E-03	0,75	3,5E-04		
264	1,77	8,5E-03	1,59	1,4E-03	0,74	8,5E-03	0,00	
264	1,98	3,5E-03	1,37	3,5E-03	0,81	9,5E-03		
288	1,78	1,4E-03	1,54	0,0E+00	0,74	1,4E-03		
288	1,81	2,8E-03	1,56	2,8E-03	0,76	0,0E+00		
312	1,65	1,4E-02	1,74	8,5E-03	0,74	2,0E-02		0,69
312	1,83	5,3E-03	1,46	7,1E-03	0,74	1,8E-03		
336	1,70	8,5E-03	1,67	1,3E-02	0,74	2,1E-02	0,01	
336	1,84	1,1E-02	1,39	1,1E-03	0,76	5,7E-03		
360	1,63	4,2E-03	1,65	1,8E-02	0,74	2,0E-02		0,62
360	1,79	3,5E-04	1,35	3,9E-03	0,76	3,5E-04		
384	1,59	1,4E-03	1,60	1,4E-03	0,75	1,6E-02		0,62
384	1,86	0,0E+00	1,36	1,4E-03	0,84	2,5E-03		
408	1,56	4,2E-03	1,65	2,8E-03	0,77	1,4E-03	0,01	
408	1,71	3,5E-03	1,37	2,1E-03	0,78	3,5E-03		
432	1,49	1,4E-03	1,64	1,1E-02	0,76	1,8E-02		0,58
432	1,69	3,2E-03	1,36	2,8E-03	0,79	3,9E-03		
456	1,62	4,2E-03	1,54	1,3E-02	0,77	2,4E-02	0,04	

Tabela B9 - Resumo dos dados obtidos no experimento 6 e apresentados na figura 37 e 39. Células aderidas foram quantificadas pelo método do MTT na fase spinner, estimativa por $Y_{x/s}$ na fase fibra oca e células livres pela contagem em hemacitômetro. O pH foi medido com eletrodo padrão.

Tempo (h)	Média do número de células aderidas	Desvio padrão	Número de células livres na suspensão	pH
0	6,25E+06			7,33
8	6,58E+06	7,06E+04	3,13E+05	7,31
24	9,55E+06	0,00E+00		7,28
48	1,33E+07	0,00E+00		7,27
72	1,69E+07	1,05E+05		7,19
96	2,36E+07	7,87E+04		7,14
120	3,22E+07	1,44E+05		7,18
144	4,23E+07	8,92E+05		7,14
168	5,33E+07	6,16E+05		7,12
192	6,79E+07	7,87E+04		7,14
216	8,17E+07	1,97E+05		7,12
240	9,56E+07	5,25E+04		7,03
248	1,95E+07	3,18E+05	4,47E+06	

Tabela B10 - Resumo dos dados obtidos no experimento 6 e apresentados na figura 38 e 39. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12).

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Desvio padrão	Lactato (mmol)	Desvio padrão	Glutamina (mmol)	Arginina (mmol)	Amônia (mmol)
0	0,53	0,0E+00	0,13	3,5E-04	0,15	0,10	
8	0,50	3,5E-04	0,16	3,5E-04	0,13	0,08	0,03
9	2,22	0,0E+00	0,56	0,0E+00	0,55	0,45	
24	2,14	0,0E+00	0,59	0,0E+00	0,64	0,42	0,11
48	2,04	0,0E+00	0,76	0,0E+00	0,55	0,35	
48	2,08	0,0E+00	0,78	4,2E-03	0,55	0,35	
72	1,98	2,8E-03	0,94	1,4E-03	0,55	0,35	0,31
72	2,02	2,1E-03	0,85	1,1E-03	0,59	0,37	
96	1,84	2,8E-03	1,17	1,4E-03	0,57	0,34	
96	2,02	7,4E-03	1,06	4,9E-03	0,60	0,36	
120	1,78	1,4E-03	1,42	4,2E-03	0,60	0,29	0,31
120	1,87	8,8E-03	1,18	8,5E-03	0,64	0,33	
144	1,59	1,1E-02	1,58	2,8E-03	0,46	0,16	
144	1,77	1,1E-03	1,36	9,2E-03	0,53	0,23	
168	1,48	8,5E-03	1,77	5,7E-03	0,50	0,09	0,49
168	1,78	8,8E-03	1,49	7,1E-03	0,56	0,18	
192	1,38	5,7E-03	1,94	5,7E-03	0,42	0,01	
192	1,66	5,3E-03	1,61	3,5E-03	0,51	0,13	
216	1,29	8,5E-03	2,04	0,0E+00	0,61	0,01	0,58
216	1,61	3,2E-03	1,68	8,8E-03	0,65	0,12	
240	1,23	7,1E-03	2,04	0,0E+00	0,42	0,00	

Tabela B11 - Resumo dos dados obtidos no experimento 7 e apresentados na figura 41. Células aderidas foram quantificadas pelo método do MTT na fase spinner, estimativa por $Y_{x/s}$ na fase fibra oca e células livres pela contagem em hemacitômetro. O pH foi medido com eletrodo padrão.

Tempo (h)	Média do número de células aderidas	Desvio padrão	Número de células livres na suspensão	pH
0	6,25E+06	0,0E+00		7,30
8	7,61E+06	0,0E+00	3,75E+05	7,33
24	8,35E+06	0,0E+00		7,42
48	1,24E+07	5,2E+05		7,44
72	1,86E+07	2,1E+05		7,38
96	2,56E+07	3,9E+05		7,32
120	3,34E+07	2,6E+04		7,26

Tabela B12 - Resumo dos dados obtidos no experimento 7 e apresentados na figura 42. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo (item 4. 12).

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Desvio padrão	Lactato (mmol)	Desvio padrão	Glutamina (mmol)	Arginina (mmol)	Amônia (mmol)
0	0,57	3,5E-03	0,14	3,5E-04	0,13	0,06	
8	0,52	0,0E+00	0,17	7,1E-04	0,12	0,05	0,03
10	2,24	0,0E+00	0,55	2,8E-03			
24	2,22	0,0E+00	0,64	1,4E-03			0,10
24	2,18	0,0E+00	0,63	1,4E-03			
48	2,11	1,4E-02	0,82	2,8E-03	0,49	0,20	
48	2,12	0,0E+00	0,82	0,0E+00			
72	1,94	5,7E-03	1,10	1,4E-03			0,26
72	1,96	6,4E-03	1,12	7,1E-03			
96	1,76	1,1E-02	1,42	5,7E-03	0,42	0,13	
96	1,80	7,1E-04	1,45	2,1E-03			
120	1,54	7,1E-04	1,88	1,4E-03	0,35	0,02	