Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Sâmia Rigotto Caruso

**Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de
células mesenquimais estromais multipotentes em
microcarregadores**

Ribeirão Preto

2012

SÂMIA RIGOTTO CARUSO

**Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de
células mesenquimais estromais multipotentes em
microcarregadores**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Clínica Médica.

Área de Concentração: Investigação
Biomédica

Orientadora: Prof. Dra. Aparecida Maria
Fontes

Coorientadora: Prof. Dra. Kamilla Swiech

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Caruso, S.R.

Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de células mesenquimais estromais multipotentes em microcarregadores/ Sâmia Rigotto Caruso; Orientadora Aparecida Maria Fontes. – Ribeirão Preto, 2012.

136p.: il.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica.

1. Células mesenquimais. 2. Microcarregadores. 3. Frasco *spinner*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sâmia Rigotto Caruso

Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de células mesenquimais estromais multipotentes em microcarregadores.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Investigação Biomédica

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Sou um só, mas ainda assim sou um. Não posso fazer tudo, mas posso fazer alguma coisa. E, por não poder fazer tudo, não me recusarei a fazer o pouco que posso.”

Edward Everett Hale

**Dedico este trabalho ao Alyrio, meu companheiro, amigo,
amor da minha vida, minha luz nos momentos difíceis,
minha paz nos momentos conturbados. À minha mãe,
minha estrela-guia, uma referência de mulher. E ao meu
anjo da guarda, meu avô, que deve estar muito orgulhoso
desta conquista.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rose e Esio, meu chão, minha vida, a base de tudo. À minha sempre irmãzinha Glaucia, pela compreensão, pela descontração nos momentos estressantes e pela palavra amiga.

À minha avó Alice e Tia Nice por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos meus avós José, Arnaldo e Mercedes pelo exemplo de vida.

Aos meus tios(as) pela força e incentivo!

À minha sogra, meus cunhados(das), meus sobrinhos e sobrinha, por terem enriquecido a minha família.

Difícil é transpor em palavras o amor e eterna gratidão que sinto por vocês.

À Kamilla, pela orientação, paciência, dedicação e empenho em me ajudar a lidar com os obstáculos que surgiram pelo meio do caminho.

À Maristela, que além de chefe foi amiga e compreensiva, pelo apoio, incentivo e disponibilidade de estar sempre pronta para ajudar!

À Karina e a Taísa, amigas de verdade, pela paciência, força e colaboração, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido!

Ao Professor Dr. Dimas Tadeu Covas por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de começar.

À Aparecida pela confiança na minha capacidade para realizar este trabalho.

**Agradeço a todos aqueles que de alguma forma participaram da elaboração
deste trabalho.**

Aline Bueno
Amanda Colombini
Amanda Mizukami
Aline Cristina Garcia Silva
Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo
Claudio Alberto Torres Suazo
Daiane Fernanda dos Santos
Danielle Aparecida Rosa de Magalhães
Everton de Brito
Hudson Bezerra
Josiane Serrano Borges
Karen de Lima Prata
Marcela Freitas
Maria Angélica Miglino
Mário Soares Neto
Patrícia Vianna Bonini Palma
Priscilla Carnavale
Ricardo Bonfim
Rose Eli Grassi Rici
Sandra Navarro
Valéria Ferreira da Siva
Viviane de Cássia Oliveira

Centro de Terapia Celular e Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas de Ribeirão
Preto

Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Amaral Carvalho de Jaú

Aos médicos e enfermeiros que direta ou indiretamente colaboraram para este estudo, sempre pensando no bem estar dos pacientes e doadores envolvidos.

Aos pacientes e doadores, acreditaram e participaram desta pesquisa.

RESUMO

CARUSO, S.R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de células mesenquimais estromais multipotentes em microcarregadores.**

[dissertação] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012, 136f.

As células mesenquimais estromais multipotentes (CMM) são na atualidade uma fonte atrativa para aplicações na engenharia de tecidos e na terapia celular. Devido à baixa disponibilidade nos tecidos (0,01%-0,0005%) e às elevadas doses necessárias para uma infusão (aproximadamente 10^6 células/Kg paciente) tornou-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de expansão *in vitro*, eficientes e de custo reduzido, que permitam a obtenção de CMM com manutenção das características funcionais (diferenciação e inibição da proliferação de linfócitos), imunofenotípicas e citogenéticas. As CMM são células aderentes, ou seja, necessitam de um substrato sólido para se aderir e proliferar. O procedimento convencional de expansão em garrafas estáticas, geralmente envolve um processo laborioso em que não há correto controle e monitoramento dos parâmetros de cultivo e possui uma maior susceptibilidade à contaminação devido à excessiva manipulação para atingir o número ideal de células. Além disso, este tipo de cultivo não permite uma produção em larga escala. Em função disso, o presente trabalho foi proposto com o objetivo de desenvolver um bioprocesso escalonável, economicamente viável e eficiente para expansão de CMM derivadas da medula óssea em microcarregadores. Para isso, as células foram cultivadas em microcarregador Cyotdex 3, em frasco *spinner* com o meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. Foram avaliadas neste trabalho, a adesão celular aos microcarregadores, crescimento, metabolismo, recuperação celular final e avaliação das propriedades funcionais e imunofenotípicas pré e pós cultivo, comparando ao cultivo já estabelecido em garrafas estáticas. De maneira geral, os resultados obtidos mostraram que foi possível expandir CMM utilizando a tecnologia de microcarregadores. A análise do metabolismo celular mostrou que não houve exaustão de nutrientes importantes como glicose e glutamina durante o cultivo, tampouco formação dos subprodutos lactato e amônia em concentrações inibitórias. As células recuperadas após a expansão mantiveram as características imunofenotípicas e funcionais. A produção média ($n=10$) foi de aproximadamente $4,9 \times 10^5$ cel/mL. Como o sistema utilizado permite o escalonamento, se utilizássemos um biorreator de 1L, seria possível a produção de aproximadamente 5×10^8 células que seriam suficientes para tratar mais de 3 pacientes de até 70Kg na dose de 2×10^6 células/Kg. Para expansão da mesma quantidade de células na forma tradicional seriam necessárias 135 garrafas de 175 cm² com um custo total de expansão duas vezes superior à estimativa do custo de expansão utilizando microcarregadores.

Palavras chave: microcarregadores, frasco *spinner*, células mesenquimais estromais multipotentes

ABSTRACT

CARUSO, SR. Bioprocess development for expansion of mesenchymal stem cells on microcarriers.[dissertation] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012, 136f.

Multipotent mesenchymal stromal cells are currently an attractive source for applications in tissue engineering and cell therapy. Due to the low availability in tissues (0,01%-0,0005%) and the high doses necessary for an infusion (about 10^6 cells/Kg patient), it has become necessary the development of effective and low cost technologies for *in vitro* expansion that enable to obtain MSC with maintenance of functional (differentiation and inhibition of lymphocytes proliferation), immunophenotypic and cytogenetics characteristics. MSC are adherent cells, i.e., they need a solid substrate to adhere and proliferate. The conventional procedure for expansion in static flasks normally involves a laborious process in which there is no suitable control and monitoring of the cultivation parameters besides presenting a higher susceptibility to contamination due to excessive manipulation to reach the ideal amount of cells. Moreover, this kind of cultivation does not allow a large scale production. For this reason, this work was proposed with the objective to develop a low cost, effective and scalable bioprocess for expansion of bone marrow-derived MSC in microcarriers. Cells grew on microcarriers Cyotdex 3, in spinner flasks with the α -MEM medium supplemented with 15% FBS. We evaluated the cell adhesion to microcarriers, growth, metabolism, final cell recovery, and the functional and immunophenotypic properties before and after cultivation, comparing them with the cultivation already established in static flasks. In general, the results obtained showed that it was possible to expand MSC using microcarriers' technology. The analysis of the cell metabolism showed that there was no depletion of important nutrients such as glucose and glutamine during cultivation, neither formation of lactate and ammonia subproducts in inhibitory concentrations. The cells recovered after the expansion kept the immunophenotypic and functional characteristics. The mean production (n=10) was about $4,9 \times 10^5$ cel/mL. As the system used allows the scale-up, if we had used a bioreactor of 1L it would had been possible to produce approximately 5×10^8 cells that would be enough to treat more than three patients of up to 70kg with a dose of 2×10^6 cells/kg. For the expansion of the same amount of cells in the traditional way, it would be necessary 135 T-flasks of 175 cm^2 with total cost twice higher than the estimate cost of expansion using microcarriers.

Keywords: microcarriers, spinner flasks, mesenchymal stem cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1.1: Ontogenia das células-tronco.	02
Figura 1.2: Morfologia das CMM	05
Figura 1.3: Princípio da engenharia de tecidos.	07
Figura 1.4: Métodos de cultivo celular e tipos de biorreatores utilizados para expansão e diferenciação de células-tronco.	12
Figura 1.5: Representação esquemática dos biorreatores utilizados para expansão de células-tronco.	12
Figura 1.6: Imagem de um microcarregador colonizado por células.	17
Figura 1.7: Imagem de um microcarregador macroporoso cortado ao meio e microcarregadores microporosos colonizados por células para a produção de vacinas.	19
Figura 1.8: Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.	21
Figura 1.9: Representação simplificada do metabolismo da glicose e da glutamina em uma célula animal.	23
Figura 4.1: Representação esquemática do microcarregador Cytodex 3.	29
Figura 4.2: Representação esquemática das reações enzimáticas envolvidas no método de LDH.	31
Figura 4.3: Representação esquemática do procedimento experimental adotado durante a realização do trabalho.	39
Figura 5.1: – Crescimento celular de células originadas de diferentes fontes (CMM-MO e CMM-VCU).	48
Figura 5.2: Células em suspensão durante as 6 primeiras horas de cultivo.	50
Figura 5.3: Densidade de células em suspensão e células mortas durante o período de adesão.	50
Figura 5.4: Crescimento das CMM cultivadas em microcarregador Cytodex 3.	51
Figura 5.5: Densidade de células aderidas, células mortas e suspensão celular durante o cultivo em frasco <i>spinner</i> .	52
Figura 5.6: Evolução pH durante os 7 dias de cultivo em frasco <i>spinner</i> .	53

Figura 5.7: Microscopia de contraste de fase das CMM-MO durante o cultivo.	53
Figura 5.8: Microscopia eletrônica de varredura das CMM-MO aderidas aos microcarregadores em diferentes dias de cultivo.	54
Figura 5.9: Expansão das CMM-MO no microcarregador Cytodex 3 e em garrafa estática.	55
Figura 5.10: Concentração de glicose e glutamina durante o cultivo em frasco <i>spinner</i> e em garrafa estática.	56
Figura 5.11: Consumo de glicose e glutamina acumulado durante o cultivo em frasco <i>spinner</i> e em garrafa estática.	56
Figura 5.12: Concentração de ácido láctico e amônia durante o cultivo em frascos <i>spinner</i> e em garrafas estáticas.	57
Figura 5.13: Produção de ácido láctico e amônia acumulados durante o cultivo realizado em frascos <i>spinner</i> e em garrafas estáticas.	58
Figura 5.14: Perfil da concentração de aminoácidos na cultura estática e frasco <i>spinner</i> durante 7 dias de cultivo.	59
Figura 5.15: Recuperação celular utilizando <i>Tryple</i> pós cultivo em microcarregador Cytodex 3.	60
Figura 5.16: Principais marcadores imunofetotípicos das CMM pré e pós cultivo em microcarregador Cytodex 3.	62
Figura 5.17: Diferenciação celular em adipócitos e osteócitos pré (garrafas estáticas) e pós cultivo em frasco <i>spinner</i> .	63
Figura 5.18: Inibição da proliferação de linfócitos pelas CMM-MO pré e pós cultivo em frasco <i>spinner</i> .	64
Figura 5.19: Cariótipo das CMM-MO pós cultivo em frasco <i>spinner</i> .	65
Figura 5.20: Crescimento celular em função do aumento gradativo da agitação.	68
Figura 5.21: Efeito do aumento gradativo da velocidade de agitação no crescimento celular e na formação de agregados.	69
Figura 5.22: Avaliação do efeito de diferentes condições na adesão e no crescimento celular.	71
Figura 5.23: Crescimento celular com cultivos subseqüentes e/ou aumento gradativo da agitação.	73

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1: Principais características dos diferentes biorreatores utilizados no cultivo de células tronco.	13
Tabela 1.2: Características dos microcarregadores comerciais disponíveis e seus respectivos fabricantes.	18
Tabela 1.3: Principais estudos que descrevem a expansão de células mesenquimais estromais multipotentes em microcarregadores	20
Tabela 1.4: Principais estudos que descrevem o metabolismo de CMM em microcarregadores.	26
Tabela 4.1: Características do microcarregador Cytodex 3.	29
Tabela 5.1: Parâmetros metabólicos determinados na fase de crescimento exponencial para CMM cultivadas em microcarregadores e em garrafas estáticas.	59
Tabela 5.2: Inibição da proliferação de linfócitos pelas CMM-MO.	64
Tabela 5.3: Custo estimado do cultivo em microcarregador para produção de $1,5-2 \cdot 10^8$ células.	66
Tabela 5.4: Custo estimado do cultivo em garrafas estáticas para produção de $1,5-2 \cdot 10^8$ células.	66
Tabela 5.5: Adesão e crescimento celular nas diferentes condições de cultivo estudadas.	71
Tabela B1: Nomenclatura das amostras	107
Tabela C1: Crescimento celular em cultura estática/cm ²	108
Tabela C2: Crescimento celular em frasco <i>spinner</i> /cm ²	108
Tabela D1: Adesão das células aos microcarregadores	109
Tabela D2: Crescimento celular em frasco <i>spinner</i>	110
Tabela D3: Suspensão celular em frasco <i>spinner</i>	111
Tabela E1: Concentração de glicose cultura estática	112

Tabela E2: Concentração de glicose frasco <i>spinner</i>	112
Tabela F1: Concentração de ácido láctico cultura estática	113
Tabela F2: Concentração de ácido láctico frasco <i>spinner</i>	113
Tabela G1: Concentração de aminoácidos cultura estática	114
Tabela G2: Concentração de aminoácidos frasco <i>spinner</i>	115
Tabela H1: Adesão em diferentes condições de cultivo	116
Tabela H2: Crescimento em diferentes condições de cultivo	117
Tabela H3: Suspensão em diferentes condições de cultivo	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
CD	do inglês, “ <i>cluster of differentiation</i> ”
CFSE	do inglês, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFU-F	unidades formadoras de colônias de fibroblastos
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CMM-MO	células estromais mesenquimais multipotentes da medula óssea
CMM-VCU	células estromais mesenquimais multipotentes da veia umbilical
CMN	células mononucleares
CO ₂	dióxido de carbono
CPE	células progenitoras endoteliais
CT	células-tronco
CTH	células-tronco hematopoéticas
DECH	doença do enxerto contra o hospedeiro
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FGF- β	do inglês, “ <i>basic fibroblast growth factor</i> ”
FITC	isotiocianato de fluoresceína
G6P	glicose-6-fosfato
GDH	glutamato desidrogenase
GTG	do inglês, “ <i>G-banding trypsin-Giemsa</i> ”
HE	hematoxilina/eosina
HLA	do inglês, “ <i>human leucocyte antigen</i> ”
HMDS	hexametildissilano
NADH	nicotina adenina dinucleotídeo
NH ₃	amônia
KCl	cloreto de potássio
KDR	do inglês, “ <i>kinase insert domain containing receptor</i> ”
LDH	lactato desidrogenase
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
PBS	do inglês, “ <i>phosphate buffered saline</i> ”

PHA	do inglês “ <i>phytohemagglutinin</i> ”
PE	ficoeritrina
PPC	ciclo das pentoses fosfato
RPMI	meio “Roswell Park Memorial Institute”
SDF	do inglês, “ <i>stromal derived factor</i> ”
SFB	soro fetal bovino
TGF	do inglês, “ <i>transforming growth fator</i> ”
VEGF	do inglês, “ <i>vascular endothelial growth factor</i> ”
α-MEM	do inglês, “minimal essential medium-alpha”

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Células-tronco	01
1.2 Células estromais mesenquimais multipotentes	03
1.2.1 <i>Características morfológicas e imunofenotípicas</i>	05
1.2.2 <i>Uso clínico</i>	06
1.2.2.1 <i>Medicina regenerativa</i>	06
1.2.2.2 <i>Propriedades imunomodulatórias</i>	09
1.3 Tecnologias de cultivo disponíveis para expansão de células-tronco	10
1.3.1 <i>Garrafas estáticas</i>	10
1.3.2 <i>Biorreatores</i>	11
1.3.3 <i>Microcarregadores</i>	16
1.3.3.1 <i>Expansão das CMM em microcarregadores</i>	19
1.4 Cinética de crescimento das células em cultura	21
1.4.1 <i>Metabolismo das células em cultura</i>	23
2 HIPÓTESE	27
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Aspectos éticos	28
4.2 Materiais	28
4.2.1 <i>Células mesenquimais estromais multipotentes</i>	28
4.2.2 <i>Meios de cultura</i>	29
4.2.3 <i>Microcarregadores</i>	29
4.3 Métodos Analíticos	30
4.3.1 <i>Determinação da densidade celular</i>	30
4.3.2 <i>Determinação da viabilidade celular</i>	31
4.3.3 <i>Determinação da morte celular pelo método LDH</i>	31
4.3.4 <i>Análise de glicose e ácido láctico</i>	32

4.3.5 <i>Análise de aminoácidos</i>	32
4.3.6 <i>Análise de amônia</i>	32
4.3.7 <i>Caracterização imunofenotípica das CMM</i>	33
4.3.8 <i>Caracterização funcional das CMM</i>	34
4.3.8.1 <i>Potencial de diferenciação em adipócitos e osteócitos</i>	34
4.3.8.2 <i>Potencial de inibição da proliferação de linfócitos T</i>	35
4.3.9 <i>Perfil citogenético</i>	37
4.3.9.1 <i>Bandeamento das CMM</i>	38
4.3.10 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	38
4.4 Procedimentos Experimentais	39
4.4.1 <i>Isolamento das CMM</i>	39
4.4.2 <i>Preservação e descongelamento das células</i>	41
4.4.3 <i>Cultivo em garrafas estáticas</i>	41
4.4.4 <i>Cultivo em microcarregador e frasco spinner</i>	41
4.5 Metodologia de Análise dos Resultados	42
5 RESULTADOS	46
5.1 Estudos preliminares para seleção de condições de cultivo	46
5.2 Expansão de CMM no microcarregador Cytodex 3 em frasco spinner para avaliação da cinética de crescimento e recuperação de células funcionais	49
5.2.1 <i>Cinética de crescimento celular</i>	49
5.2.1.1 <i>Adesão das células às partículas de microcarregadores</i>	49
5.2.1.2 <i>Crescimento celular</i>	51
5.2.2 <i>Metabolismo celular</i>	55
5.2.3 <i>Recuperação celular pós cultivo</i>	60
5.2.4 <i>Avaliação imunofenotípica e funcional pós cultivo</i>	61
5.2.4.1 <i>Imunofenotipagem</i>	61
5.2.4.2 <i>Diferenciação</i>	62
5.2.4.3 <i>Inibição da proliferação de linfócitos T</i>	63
5.2.5 <i>Análise citogenética</i>	64
5.2.6 <i>Estimativa de custo dos consumíveis durante o processo de expansão</i>	65

5.3 Otimização das condições de cultivo visando aumento da recuperação celular	67
5.3.1 <i>Velocidade de agitação</i>	67
5.3.2 <i>Condições de adesão</i>	70
5.3.3 <i>Cultivos sucessivos</i>	72
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido	101
APÊNDICE B - Nomenclatura das amostras	107
APÊNDICE C - Crescimento celular em cultura estática e frasco <i>spinner/cm²</i>	108
APÊNDICE D - Adesão, crescimento e suspensão (10 amostras)	109
APÊNDICE E - Concentração de glicose em cultura estática e frasco <i>spinner</i> .	112
APÊNDICE F - Concentração de ácido láctico em cultura estática e frasco <i>spinner</i>	113
APÊNDICE G - Concentração de aminoácidos em cultura estática e frasco <i>spinner</i>	114
APÊNDICE H - Adesão, crescimento e suspensão em diferentes condições de cultivo	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco

Nos últimos 20 anos, o interesse da medicina pelo uso das células-tronco como ferramenta para terapia celular e terapia gênica tem aumentado de maneira significativa. Isto tem sido impulsionado por inúmeras descobertas, em especial, pela localização dessas células nos mais diversos tecidos e pela regeneração destes no decorrer da vida (YOUNG et al., 2001; ZUK et al., 2001; COVAS et al., 2003; ALSALAMEH et al., 2004, IGURA et al., 2004; SABATINI et al., 2005; COVAS et al, 2008). Células-tronco como as hematopoéticas, mesenquimais, endoteliais, neurais, dentre outras, das mais diversas origens e com diferentes potenciais de diferenciação e proliferação, vêm sendo amplamente estudadas (CAPLAN, 2007).

As células-tronco (CT) podem ser subclassificadas de acordo com o seu potencial de diferenciação e/ou origem. São **totipotentes** quando diferenciam-se em membranas e tecidos extra-embrionários, no embrião e em todos os tecidos e órgãos fetais, ou seja, originam um novo indivíduo. As **pluripotentes** têm a habilidade de originar as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma) conforme mostrado na Figura 1.1, ou seja, qualquer célula do organismo, mas são incapazes de gerar um novo indivíduo (VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002). Já as **multipotentes** originam quatro ou mais linhagens celulares. Também podem ser **tri**, **bi** ou **unipotentes** se originarem três, dois ou apenas um tipo celular, respectivamente (YOUNG; BLACK Jr., 2004). Classicamente, as células toti ou pluripotentes são de origem embrionária enquanto as células multi ou unipotentes são encontradas no feto, na criança e no adulto.

Figura 1.1 – Ontogenia das células-tronco (adaptado de CAPLAN, 2007).

Considera-se como célula embrionária aquela isolada da massa interna do blastocisto ou da prega gonadal do embrião. Esta pode se proliferar indefinidamente, mantendo o seu potencial de diferenciação em todos os tecidos do organismo em desenvolvimento (DALEY; GOODELL; SNYDER, 2003).

Populações de CT podem ser encontradas na maioria dos tecidos do adulto, como por exemplo, na medula óssea, no sangue periférico, na placenta, no cordão umbilical, além de diversos tecidos fetais. Até o momento, as células que estão mais bem caracterizadas são as células-tronco hematopoéticas (CTH), as células estromais mesenquimais multipotentes (CMM) e as células progenitoras endoteliais (CPE).

As CTH são células tronco multipotentes bem caracterizadas pelo marcador CD34, sendo sua principal fonte a medula óssea. Elas são definidas funcionalmente por sua habilidade de repovoar a medula com células de todas as linhagens que compõem o sistema sanguíneo (SPANGRUDE; HEIMFELD; WEISSMAN, 1988).

Já as CPE, encontradas no sangue de cordão umbilical, são tipicamente identificadas pela citometria de fluxo por expressarem os antígenos de superfície

CD34, CD133 e o VEGFR-2, também conhecido como KDR, e por não apresentarem o CD45, antígeno característico de células hematopoéticas maduras.

Tendo em vista a grande importância do estudo do comportamento *in vivo* das CMM aliado à necessidade de produção das mesmas em larga escala, foco principal desse trabalho, as mesmas serão melhores descritas a seguir.

1.2 Células mesenquimais estromais multipotentes

As CMM foram primeiramente identificadas por Friedenstein et al (1966), que as isolaram da medula óssea de ratos. Estas células foram inicialmente denominadas células aderentes ao plástico ou unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F), sendo posteriormente chamadas de células estromais da medula ou células tronco mesenquimais. Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular optou pelo termo células mesenquimais estromais multipotentes e estabeleceu 3 critérios básicos para defini-las:

- a) a capacidade de aderência ao plástico;
- b) expressão positiva ($\geq 95\%$) de antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90 e negativa ($\leq 2\%$) de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alfa ou CD19 e HLA-DR;
- c) capacidade de diferenciação na linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006).

No ser humano as CMM têm a medula óssea como a sua principal fonte. Contudo, já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como o tecido muscular esquelético e a derme (YOUNG et al., 2001), o tecido adiposo (ZUK et al., 2001), a membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), o endotélio e subendotélio da veia umbilical (COVAS et al., 2003) e da veia safena (COVAS et al., 2005), o rim (ALMEIDA-PORADA et al., 2002), o sangue de cordão umbilical e placentário (LEE et al., 2004a; LEE et al., 2004b; YU et al., 2004), a medula óssea vertebral (AHRENS et al., 2004), a cartilagem articular (ALSALAMEH et al., 2004), a vilosidade coriônica da placenta (IGURA et al., 2004), o ligamento periodontal (SEO et al., 2004), e o pulmão (SABATINI et al., 2005), dentre outros. As células mesenquimais estromais multipotentes da veia umbilical (CMM-VCU) foram isoladas por nosso grupo de pesquisa em 2003 (COVAS et al., 2003), sendo

demonstrado as similaridades biológicas das mesmas quando comparadas as CMM isoladas da medula óssea. Em um estudo subsequente, foi identificada a presença das mesmas no nicho vascular de 11 diferentes tecidos: cordão umbilical, carótida, fáscia do músculo reto abdominal, gônadas, fígado e pele de fetos provenientes de aborto, pele, tecido adiposo, veia safena, retina e medula óssea de indivíduos adultos (COVAS et al, 2008).

Dentre as principais funções das CMM está a sustentação da hematopoese. Estas células liberam fatores de crescimento e citocinas, tais como o SDF1, que está envolvido na manutenção, proliferação e sobrevivência das células-tronco hematopoéticas (KORTESIDIS et al., 2005).

Além de suportar a hematopoese, as CMM têm sido alvo de inúmeras pesquisas devido às suas propriedades imunomodulatórias (NAUTA & FIBBE, 2007). Estas células têm sido utilizadas como medida profilática para evitar que a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) se instale (TISATO et al., 2007), ou como tratamento, para amenizar e até tratar quadros clínicos graves oriundos desta síndrome (LE BLANC et al., 2004). No entanto, ainda são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos responsáveis por este fenômeno de imunomodulação para que se possa entender melhor o papel que as CMM desempenham.

Outra função das CMM reside na sua capacidade de migração para os mais diversos tecidos, mediada por quimiocinas e seus receptores, apesar de Fischer e colaboradores demonstrarem em 2009 que quando infundidas via intravenosa, essas células ficam retidas no pulmão.

1.2.1 Características morfológicas e imunofenotípicas

Figura 1.2 – Morfologia das CMM. Em (A) aumento 40x e (B) aumento 100x.

As CMM apresentam morfologia fibroblastóide alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante à microscopia de luz ou contraste de fase. Também podem ser observadas à microscopia eletrônica, cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de poli-ribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades (TAGAMI et al., 2003). Quando senescentes, as CMM são grandes, largas, achatadas, proliferam lentamente e expressam uma β -galactosidade associada à senescência (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005). Células com morfologia intermediária são observadas no decorrer do cultivo (DIGIROLAMO et al., 1999).

As CMM são caracterizadas por um vasto painel de antígenos de superfície. Estas células se apresentam positivamente marcadas para moléculas de adesão e integrinas, tais como, CD29, CD44 e CD49e, e, negativas para antígenos característicos de células endoteliais, dentre eles, CD31 e KDR e antígenos característicos de células hematopoéticas, tais com o CD34 e o CD45 (ALHADLAQ; MAO, 2004).

Outros marcadores foram descritos por Bühring *et al*, o CD271 e o CD140b, cuja presença estaria relacionada às células mesenquimais mais progenitoras. No entanto, até o presente momento, ainda não há um marcador específico para as CMM (BÜHRING et al., 2007).

As CMM são facilmente cultivadas em culturas em monocamada, ou seja, aderidas ao plástico, e sua expansão parece depender da fonte da qual elas foram obtidas e do método utilizado para isolamento destas células.

1.2.2 Uso clínico

A terapia celular compreende um conjunto de técnicas ou métodos que visam substituir as células doentes ou disfuncionais por células saudáveis. Compreende a medicina regenerativa, os transplantes com CTH, a imunoterapia, a aférese, a criobiologia, a imunoseleção e a terapia gênica.

1.2.2.1 Medicina regenerativa

As CMM, devido ao seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, têm se tornado candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004; LE BLANC; PITTENGER, 2005).

Uma das áreas também exploradas para uso clínico das CMM é o uso na Engenharia de Tecidos, em que a promessa é a construção *in vitro* de tecidos para serem transplantados em indivíduos acometidos por doenças até hoje consideradas incuráveis. Basicamente, são necessários três componentes principais:

- a) um suporte tridimensional adequado;
- b) células apropriadas
- c) adição de substâncias bioativas ideais como fatores de crescimento, citocinas, hormônios, ou seja, o estímulo apropriado para diferenciação específica das células, como mostra a Figura 1.3 (CSAKI et al., 2008).

Dentro do campo da Engenharia de Tecidos, as CMM estão sendo utilizadas para o tratamento de doenças locais como: defeitos ósseos, defeitos na cartilagem e no tendão e os estudos são realizados primeiramente em animais. As células injetadas em locais específicos foram bem toleradas e bons resultados foram obtidos nesses tratamentos (ABDALLAH; KASSEM, 2007).

Figura 1.3- Princípio da engenharia de tecidos. A - material biocompatível, B- células adequadas (célula-tronco) e C- substâncias bioativas para estimular a diferenciação específica (CSAKI et al., 2008).

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

Yoshikawa e colaboradores (1996) expandiram CMM de ratos *in vitro* dentro de suporte (“scaffold”) de hidroxiapatita porosa. Após uma semana de implantação subcutânea, já pôde ser observada formação e maturação do osso.

A primeira demonstração de que as CMM poderiam ser úteis nos casos de defeitos ósseos vieram de estudos realizados com pacientes com a doença osteogênese imperfeita (doença genética caracterizada por fraturas repetidas nos ossos) que receberam transplante alogênico da medula óssea. O tratamento resultou no enxerto de osteoblastos, aumentando o conteúdo mineral de osso no corpo e crescimento no esqueleto (JORGENSEN et al., 2004).

Uma das promessas para aplicações ortopédicas é o uso natural de biomateriais para suporte das CMM. Há uma tendência em substituir o uso de materiais não-porosos e inertes (cerâmica e titânio) por materiais porosos e biomateriais osteocondutivos (hidroxiapatita e fosfato tricálcico). Compostos de cerâmica hidroxiapatita/fosfato tricálcio carregados com CMM autólogas expandidas *in vitro* mostraram resultados positivos para defeitos ósseos de camundongos (KRAMPERA et al., 2006).

A promessa da engenharia de tecidos mais relevante está relacionada aos defeitos condrogênicos, devido ao fato da cartilagem ter um baixo potencial de

autocura no caso de danos severos, causados por anormalidades, trauma, ou degeneração causado pela idade como osteoartrite (WANG et al., 2005).

O uso de CMM autólogas e suportes porosos tridimensionais tem demonstrado um poderoso potencial de reparo nos danos das cartilagens. Idealmente, tais suportes devem ter estrutura ótima e propriedades mecânicas, excelente biocompatibilidade e controle da razão de degradação (WANG et al., 2005). Numerosas investigações *in vitro* e *in vivo* têm sido feitas com suportes biocompatíveis contendo agarose, ácido hialurônico e cola de fibrina autóloga (HEDRICK; DANIELS, 2003).

CMM derivadas da medula óssea de cabra foram injetadas com suportes hialurônicos nos joelhos das cabras depois de uma ressecção do ligamento. Os resultados mostraram a evidência de regeneração do menisco quando comparado aos animais controle. Em alguns animais, os resultados ainda mostraram um significativo remodelamento do osso subcondral, formação de cartilagem e preservação do revestimento da junta (KRAMPERA et al., 2006).

Wang e colaboradores (2005) desenvolveram um suporte para CMM através de um processo aquoso com fibroína e adicionaram dexametasona e TGF- β 3 para sobrevivência, proliferação e condrogênese de CMM. Depois de 3 semanas de cultivo, o suporte exibiu características nativas da cartilagem.

A habilidade das CMM na diferenciação tendogênica também tem sido demonstrada em diversos estudos. Por exemplo, materiais naturais modificados como colágeno tipo I, dura-máter humana ou bovina e vários outros polímeros biossintéticos incluindo ácido poliglicólico, ácido polilático e polipropileno têm sido utilizados extensivamente para esse fim (HUANG et al., 2006).

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

Dressler e colaboradores (2005) isolaram CMM de coelhos com um ano de idade e as expandiram com colágeno tipo I. Estas células foram implantadas em coelhos com defeito no terceiro tendão central. Duas semanas após a cirurgia,

melhoras nas propriedades do material incluindo estresse máximo, módulo e força foram notadas. Os resultados demonstraram que o modelo CMM de coelho é efetivo no reparo de injúrias leves no tendão.

1.2.2.2 Propriedades imunomodulatórias

Recentemente está sendo estudado o papel das CMM nos mecanismos de imunossupressão (MARIGO; DAZZI, 2011) e imunorregulação *in vitro* e *in vivo* (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008). As CMM apresentam a capacidade de modular a função de várias populações celulares do sistema imune, através de contato célula-célula e pela secreção de diversas moléculas (NAUTA E FIBBE, 2007). Alguns estudos *in vivo* em modelos animais confirmaram essa propriedade imunoreguladora/imunomoduladora das CMM. Nesses trabalhos, as CMM foram capazes de prolongar a sobrevivência de enxertos de pele alogênicos, diminuir a rejeição de células de medula óssea alogênica transplantada, e controlar diversas doenças inflamatórias e autoimunes, tais como a doença do enxerto-contrahospedeiro (DECH), a encefalomielite autoimune experimental e o diabetes autoimune (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008; BASSI et al., 2011; ZHAO et al., 2010). Estes estudos pré-clínicos têm fundamentado a aplicação terapêutica de CMM em terapias celulares em humanos para tratamento de diversas doenças imuno-mediadas (BEM-AMI; BERRIH-AKNIN; MILLER, 2011), como a DECH, doença de Crohn, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes mellitus tipo 1 e 2 (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

Em estudos que foram realizados a infusão intravenosa das CMM em humanos, não foi observado quaisquer relato de efeitos colaterais durante ou após a infusão das CMM ou desenvolvimento de tecidos neoplásicos ou ectópicos até o momento (LE BLANC; RINGDEN, 2007)

No Hemocentro de Ribeirão Preto muitas pesquisas envolvendo células mesenquimais têm sido realizadas desde 2001 (COVAS et al., 2003; SILVA et al., 2003; PANEPUCCI et al., 2004; COVAS et al., 2005; CARRARA et al., 2007; COVAS et al., 2008; DE LIMA PRATA et al., 2010). A experiência adquirida ao longo do desenvolvimento de todos esses trabalhos possibilitou a criação do Laboratório de Terapia Celular em 2007 e o início de vários estudos clínicos. Até agosto de 2011, com a aprovação devida do comitê de ética das instituições envolvidas nas pesquisas, foram infundidas 127 doses de CMM-MO para 34

pacientes portadores da doença do enxerto-contra-o-hospedeiro grave, da diabetes mellitus, da anemia aplástica, e outras condições clínicas (De Lima Prata, 2011).

1.3 Tecnologias de cultivo disponíveis para expansão de células-tronco

Apesar do potencial de reparo que as CMM têm demonstrado uma das limitações para sua ampla utilização é a necessidade de uma quantidade elevada de células, devido à baixa frequência na medula óssea 0,01%-0,0005% (CAPLAN, 2007) e as elevadas doses (aproximadamente 10^6 células/Kg paciente) necessárias para uma infusão (SUBBANNA, 2007). Para isso, o desenvolvimento de tecnologias de expansão *in vitro* que permitam a obtenção de células com adequada qualidade terapêutica e custo reduzido é de extrema importância. As principais tecnologias que vem sendo utilizadas para esta expansão serão abordadas a seguir.

1.3.1 Garrafas estáticas

O sistema de cultivo mais simples e o mais utilizado para expansão de CMM para fins terapêuticos são as garrafas de poliestireno estáticas. Neste, o cultivo celular é realizado em um compartimento único, onde os componentes do meio de cultura se difundem na direção da camada de células aderidas no fundo da garrafa. O fornecimento de oxigênio e dióxido de carbono, necessários para oxigenação e controle do pH do meio de cultura, respectivamente, ocorre através da interface estática que separa o gás e o líquido dentro da garrafa. A ausência de agitação tem como desvantagem a formação de um ambiente de cultivo heterogêneo que se caracteriza pela presença de gradientes de concentração (pH, oxigênio, substratos e metabólitos) no meio de cultura (RODRIGUES et al., 2011). Além disso este sistema possui outras limitações como, por exemplo:

- a) demanda excessiva de manipulação que pode interferir nas propriedades funcionais das células em virtude das sucessivas passagens com tratamentos enzimáticos a que as mesmas são expostas;
 - b) maior risco de contaminação;
 - c) inexistência do controle adequado dos parâmetros de cultivo (pH e oxigênio dissolvido).
-

A consequência disso é uma fisiologia celular em condição adversa, alto custo e tempo prolongado de cultivo (SCHOP et al., 2008). Esses problemas tornam-se mais complexos quando se aumenta a escala de expansão de CMM. Em função da razão área superficial/ volume de cultivo ser reduzida neste tipo de cultivo, a produção de uma grande quantidade de células implica na utilização de um grande número de garrafas ou de bandejas contendo vários andares (RODRIGUES et al., 2011).

De acordo com a experiência do Hemocentro de Ribeirão Preto na expansão de CMM para fins terapêuticos: para se obter o número de células necessário para infusão em um paciente de aproximadamente 60 quilos, ou seja, no mínimo $1,2 \times 10^8$ células em terceira passagem, são necessários 7 dias e 2×10^7 CMM em segunda passagem. A produção desta quantidade de célula envolve a utilização de 40 garrafas de 175cm^2 de área e um volume total de 3,5L de meio de cultura a um custo aproximado de consumíveis de R\$ 1.500,00.

1.3.2 Biorreatores

Biorreator pode ser definido como um sistema de cultivo que proporciona às células o adequado monitoramento e controle de variáveis de cultivo como pH, temperatura, concentração de oxigênio e dióxido de carbono (CO_2), manutenção da assepsia e ambiente físico-químico homogêneo para toda a população celular. Além disso, também pode proporcionar o suprimento de suporte para adesão celular, no caso de cultivo de células aderentes. Em função de suas características, a utilização de biorreatores para a expansão de células tronco parece ser a solução para minimizar os problemas relacionados à transferência de massa e outras limitações acima citadas inerentes ao cultivo em garrafas estáticas.

Os biorreatores que serão descritos a seguir são adequados para o cultivo de CT tanto para a expansão quanto para a diferenciação. Suas vantagens principais são além da geração de grandes quantidades de células, o contínuo monitoramento e controle do ambiente físico e químico, requisito essencial em biorreatores para cultivo de células tronco funcionais. A escolha do biorreator mais adequado para cada situação depende das características de crescimento das células (suspensão, agregados ou células aderentes), conforme mostrado na Figura 1.4 e da aplicação terapêutica das mesmas. A Figura 1.5 traz uma representação esquemática dos principais biorreatores que vem sendo utilizados

no cultivo e na expansão de células tronco e a Tabela 1.1 resume as principais características de cada sistema.

Figura 1.4 - Métodos de cultivo celular e tipos de biorreatores utilizados para expansão e diferenciação de células-tronco (ULLOA-MONTOYA; VERFAILLIE; HUS, 2005).

Figura 1.5 - Representação esquemática dos biorreatores que podem ser utilizados para expansão de células-tronco.

Tabela 1.1 - Principais características dos diferentes biorreatores utilizados no cultivo de células tronco (Adaptado de RODRIGUES et al., 2011).

Biorreator	Características Principais
Tanque agitado	<ul style="list-style-type: none"> • Design simples e condições homogêneas • Fácil operação e amostragem • Facilidade monitoramento e controle de parâmetros de cultivo • Tensões de cisalhamentos geradas pela agitação mecânica podem ser prejudiciais às células • Pode ocorrer formação de aglomerados de células e microcarregadores
Wave	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema descartável e de fácil escalonamento • Risco de contaminação minimizado, esterilização não necessária tornando adequado para operações em GMP • Relativa dificuldade na amostragem, monitoramento e controle • Alto custo
Parede rotatória	<ul style="list-style-type: none"> • Ambiente com baixa tensão de cisalhamento e troca gasosa eficiente • Sistema complexo, dificuldade no escalonamento
Placas Planas	<ul style="list-style-type: none"> • Altas produtividades podem ser alcançadas • Acumulação de subprodutos tóxicos minimizada, porém a contínua remoção de fatores secretados pelas células pode ser prejudicial • Gasto elevado de meio de cultura • Efeitos das tensões de cisalhamento ainda desconhecidos
Fibra-oca	<ul style="list-style-type: none"> • Ambiente com baixa tensão de cisalhamento e mimetiza o microambiente celular • Monitoramento e controle indireto • Formação de gradientes de concentrações • Difícil escalonamento
Leito fixo ou fluidizado	<ul style="list-style-type: none"> • Fornece estrutura tridimensional para adesão e crescimento • Interações célula-célula e célula-matriz são possíveis, mimetizando a estrutura <i>in vivo</i> • Pequenos volumes e dificuldade de escalonamento se comparado com outros sistemas • Formação de gradientes de concentrações (leito fixo) • Possíveis efeitos da tensão de cisalhamento (leito fluidizado)

Os biorreatores tipo tanque-agitado (Figura 1.5A), amplamente utilizados e bem caracterizados para cultura de células microbianas e animais, têm sido utilizados para evitar as limitações dos sistemas de cultivo estáticos. Dentre as vantagens principais, pode-se citar a homogeneidade do sistema, a facilidade de operação e aumento de escala, possibilidade de operação em batelada, batelada-

alimentada e perfusão. Neste tipo de biorreator, impelidores são utilizados para promover a mistura, resultando em um sistema de cultivo homogêneo, o que permite o monitoramento e controle dos parâmetros de cultivo e a constante retirada de amostras. Os biorreatores agitados onde as células crescem em suspensão, aglomeradas umas as outras ou aderidas em suportes especializados (microcarregadores, por exemplo) podem ser citados como exemplos. A maioria dos biofármacos comerciais produzidos em células animais utiliza este tipo de biorreator (CHU; ROBINSON, 2001).

A utilização de biorreatores agitados e escalonáveis para expansão de células-tronco pode facilitar a transição da escala laboratorial para a escala de produção clínica. A utilização de biorreatores agitados ou frascos *spinner* para expansão de células dependentes de ancoramento, como as células CMM, requer um suporte para adesão das células, como, por exemplo, os microcarregadores que serão abordados posteriormente.

Outro tipo de biorreator que têm despertado interesse na produção de células para terapia celular é o biorreator de ondas (Wave) (Figura 1.5D). A principal razão do intenso interesse reside no fato deste biorreator ser descartável e com isso facilitar a regulamentação e a garantia da qualidade do processo de expansão. Este biorreator consiste em duas partes principais: uma bolsa estéril e descartável, na qual se cultivam as células, e uma plataforma móvel que controla a agitação, a temperatura e o pH do cultivo. Essas são características atrativas para fins produtivos, especialmente quando a escala de produção não é muito grande (CHICO; RODRIGUEZ; FIGUEREDO, 2007).

Timmins e colaboradores (2012) isolaram CMM de placenta humana e a expandiram em biorreator Wave utilizando a tecnologia de microcarregadores. Tal sistema de cultivo permitiu uma expansão de aproximadamente 10 vezes no microcarregador Cytodex 3 e 15 vezes no Cultispher S em sete dias. De acordo com as estimativas dos autores e com o método de isolamento das células proposto, 500 gramas de uma placenta são suficientes para produzir células suficientes para 2 pacientes de 70 Kg com uma dose de 5×10^6 células/Kg no final da primeira passagem. Em quatro cultivos subsequentes seria possível produzir aproximadamente 7.000 doses de células por placenta em biorreatores de larga escala.

A utilização de módulos de fibras ocas (“hollow fiber”), representado na figura 1.5E, para expansão de células para uso clínico foi descrita há cerca de 20 anos por Knazek e colaboradores (1990) para a expansão de linfócitos. Este biorreator é composto por dois compartimentos divididos em espaço intracapilar e extracapilar. As células crescem no espaço extracapilar composto por uma série de membranas semipermeáveis na forma de capilares. O meio de cultura é escoado pelo interior das membranas tubulares (espaço intracapilar) cuja parede permeável permite a transferência de nutrientes e metabólitos provenientes do meio de cultura para as células no espaço extracapilar e até mesmo a retenção de determinadas proteínas de alto peso molecular, produzidas pelas células. Para o adequado fornecimento de oxigênio às células, o sistema geralmente conta com um sistema de aeração específico na linha de recirculação de meio de cultura.

Já existem disponíveis comercialmente, biorreatores de fibra oca, especialmente desenvolvido para expansão de células para terapia. O biorreator Quantum Cell Expansion System, da Beckman Coulter é um exemplo. De acordo com o fabricante, este sistema de cultivo fechado permite o aumento de escala e demonstra altas taxas de recuperação celular pós cultivo. De acordo com Antwiler (2010) com um inóculo inicial de 2×10^7 CMM em 5 dias de cultivo foi possível produzir $3,5 \times 10^8$ células totais com um tempo de duplicação celular de 28 horas.

O Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos vem desenvolvendo em parceria com o Hemocentro de Ribeirão Preto um projeto de expansão de CMM em larga escala (FINEP (0108059100) e BNDES (09.2.0706.1)). No contexto deste projeto, foi desenvolvido por Mizukami (2011) um biorreator de fibra-oca para expansão de CMM. Foi possível uma expansão celular de 11,2 vezes considerando tanto o cultivo preliminar em frasco *spinner* quanto o cultivo em biorreator. No entanto, ainda não foi possível a completa recuperação das células das fibras. Estudos neste sentido encontram-se em andamento.

O biorreator “*rotating-wall*” ou de parede rotatória (figura 1.5F) foi originalmente projetado para simular os efeitos da microgravidade e reproduzir os experimentos de crescimento celular realizados no espaço sideral. Este biorreator consiste de uma parede cilíndrica ao redor de um eixo horizontal que trabalha com baixas condições de cisalhamento. A oxigenação é realizada na ausência de bolhas de ar e o meio de cultivo é alimentado por membranas. O cilindro rotatório completamente cheio de meio de cultura (ausência de interface gás-líquido) faz o

líquido girar a uma velocidade semelhante à velocidade da parede. O sistema permite o cultivo de células aderidas à microcarregadores e em suportes (“scaffolds”) porosos (GODARA; MCFARLAND; NORDON, 2008). O sistema de parede rotatória tem sido utilizado para ressuspender microcarregadores para diferenciação osteogênica, com resultados superiores às garrafas estáticas. A diferenciação condrogênica também é realizada neste sistema. Ohyabu e colaboradores (2006) foram capazes de gerar grandes cilindros de cartilagem (1,25cm x 0,6 cm, altura x diâmetro) a partir de células de medula óssea de coelho sem *scaffold*.

A maioria dos biorreatores de placa plana, ou “*flat bed*”, representados na figura 1.5G, consiste em compartimentos separados por membranas. Em todas as configurações, a câmara celular é separada por uma membrana da câmara de meio de cultura. A maneira de transferir oxigênio seja através de um compartimento adicional de gás em contato com a câmara celular, ou através da recirculação de meio, classificam este tipo de biorreator em duas categorias. No caso da ausência de compartimento para o gás, o meio que recircula a uma alta taxa se torna a fonte de oxigênio. A inclusão de um compartimento para gás fornece concentrações de oxigênio mais uniformes através da câmara celular e permite que o suprimento de oxigênio e o suprimento de nutrientes provenientes do meio de cultura sejam controlados separadamente (ULLOA-MONTOYA; VERFAILLIE; HUS, 2005).

Como exemplo da utilização deste biorreator para expansão de CT tem-se o trabalho publicado por Wang, Brennan e Wu (1995) em que células da medula óssea murina cresceram e se diferenciaram em células do sistema hematopoético. O trabalho de Mantalaris e colaboradores (1998) que também produziram células eritróides (60% do total) em diferentes estágios de maturação, indicando que as três dimensões deste sistema de cultivo fornece um microambiente favorável para a eritropoese.

1.3.3 Microcarregadores

Desde sua introdução em 1967 por Van Wezel, os microcarregadores têm sido aplicados para o cultivo de diversas linhagens dependentes de ancoramento para a produção de biofármacos e principalmente de vacinas. Os microcarregadores são partículas, geralmente, esféricas que servem como suporte

para a adesão das células dependentes de ancoramento. Existem diversos tipos de microcarregadores comerciais disponíveis sendo que os mesmos diferem-se pela composição química, carga elétrica, revestimento superficial e porosidade (SCHOP *et al.*, 2008), conforme mostrado na Tabela 1.2. Podem ser feitos de diversos materiais como celulose, dextrana, vidro, poliestireno e colágeno ou gelatina (CHICO; RODRIGUEZ; FIGUEREDO, 2007) e são classificados como microporosos (diâmetro do poro menor que 1 μm), permitindo o crescimento celular apenas na superfície externa, ou macroporosos, permitindo a proliferação celular na superfície interna (diâmetro do poro de 10-50 μm) (FERNANDES *et al.*, 2007).

Este tipo de cultura oferece a vantagem de prover uma grande área para crescimento celular em um sistema em suspensão homogênea. Um grama de microcarregador possui uma área disponível para crescimento celular semelhante a 15 frascos de cultura de 75 cm^2 . Portanto, o cultivo das células em microcarregadores representa uma economia de tempo e custo de produção, principalmente em relação à utilização de meio de cultura e suplementos como fatores de crescimento e soro fetal bovino (MALDA; FRONDOZA, 2006). A cultura utilizando microcarregadores em suspensão também facilita a transferência de oxigênio e CO_2 e a manutenção de um ambiente homogêneo para crescimento celular. Além disso, o sistema pode ter suas condições de cultivo (pH, agitação, concentração de nutrientes) monitoradas e controladas diariamente. A Tabela 1.2 resume os principais microcarregadores disponíveis e seus respectivos fabricantes e as Figuras 1.6 e 1.7 mostram exemplos de microcarregadores colonizados por células.

Figura 1.6 – Imagem de um microcarregador colonizado por células (ZEITNEWS NANOTECHNOLOGY).

Tabela 1.2 - Características dos microcarregadores comerciais disponíveis e seus respectivos fabricantes.

MICROCARREGADOR	MATERIAL	CARGA	POROSIDADE	FABRICANTE
Cytodex™ 1	Matriz de dextrana com grupo DEAE	+	Não	GE Healthcare
Cytodex™ 3	Matriz de dextrana coberta com camada de colágeno	---	Não	GE Healthcare
Cytoline™	Polietileno/Sílica	---	Sim	GE Healthcare
Cytopore™	Matriz de celulose com grupo DEAE	+	Sim	GE Healthcare
Pronectin®F	Poliestireno recoberto com fibronectina	---	Não	SoloHill
Hillex	Poliestireno modificado	+	Não	SoloHill
Plastic Plus (PP)	Poliestireno	+	Não	SoloHill
Collagen (C)	Poliestireno recoberto com colágeno tipo I	---	Não	SoloHill
FACT III (F)	Poliestireno com colágeno porcino tipo I	+	Não	SoloHill
Cultispher-S	Gelatina Porcina	---	Sim	Percell Biolytica
P 102-L	Poliestireno	---	Não	Hyclone/SoloHill
P Plus 102 -L	Poliestireno	+	Não	Hyclone/SoloHill
Cultispher-G	Gelatina Porcina (maior estabilidade térmica e mecânica)	---	Sim	Percell Biolytica
GEM™	Partícula magnética de alginato coberta com gelatina	----	Sim	Hamilton

Figura 1.7 - Imagem de um microcarregador macroporoso cortado ao meio e microcarregadores microporosos colonizados por células para a produção de vacinas (PERCELL BIOLYTICA).

1.3.3.1 Expansão das CMM em microcarregadores

O cultivo de CMM em microcarregadores tem sido reportado na literatura como eficiente em termos da expansão das mesmas e manutenção do fenótipo original (SCHOP et al., 2008; FRAUENSCHUH et al., 2007; MALDA; FRONDOZA, 2006). Schop e colaboradores (2008) utilizaram o microcarregador Cytodex 1 para a expansão de células mesenquimais de carneiro, comparando 3 diferentes formas de cultivo (I- adição de 30% de meio a cada 3 dias durante o cultivo, II- Adição de 30% de meio contendo microcarregadores (20 cm²/mL) a cada 3 dias, III- controle, sem adições durante o cultivo) e analisaram o consumo de glicose e a produção de metabólitos como lactato e amônia durante o experimento. Os autores concluíram que a forma II de cultivo resultou em uma maior fase de crescimento que as demais, e que o número total de células viáveis aumentou linearmente até o final do cultivo, atingindo valores da ordem de 1,20x10⁷ células. Estes resultados demonstraram que a adição de microcarregadores e meio de cultura adia a fase de declínio do crescimento celular devido ao aumento da disponibilidade de área para adesão celular e da disponibilidade de nutrientes essenciais como glicose e glutamina, ao mesmo tempo em que dilui a concentração dos subprodutos tóxicos.

Esta tecnologia também vem sendo utilizada com sucesso para expansão de células tronco embrionárias (ABRANCHES et al, 2007, FERNANDES et al., 2007; FERNANDES et al., 2009, NIE et al., 2009). Fernandes e colaboradores (2007) expandiram células tronco embrionárias de camundongo em 2 tipos de microcarregadores (Cultispher S e Cytodex 3) e observaram que ambos são capazes de promover a expansão das células. No entanto a cultura em Cytodex 3 possuiu uma menor fase lag, o que justifica a escolha do mesmo neste trabalho.

De maneira geral, os resultados descritos na literatura mostram que a tecnologia de microcarregadores pode ser uma tecnologia de expansão eficiente para uma produção de CMM, com manutenção das propriedades funcionais e com custo reduzido quando comparado ao custo de expansão utilizando garrafas estáticas, porém quase todos os artigos publicados são focados na expansão e no metabolismo das células envolvidas no estudo, apenas alguns mostram a recuperação celular (BOO et al., 2010). Em função disto o presente estudo teve como uma das principais preocupações a procura de uma técnica de cultivo que, além de uma boa expansão celular, conseguisse também uma alta eficiência de recuperação celular. A Tabela 1.3 sumariza os principais trabalhos que descrevem a utilização da tecnologia de microcarregadores para a expansão de CMM.

Tabela 1.3 – Principais estudos que descrevem a expansão de células estromais mesenquimais multipotentes em microcarregadores

Tipo Celular	MC*	X** inicial (cel/mL)	X** final (cel/mL)	Tempo cultivo (dias)	$\mu_{\max}$ (d ⁻¹)	Expansão (vezes)	Ref.
CMM da medula óssea (humana)	Cultispher S	5,25x10 ⁴	4,2x10 ⁵	8	0,41	8,0	Eibes, 2010
Células de sertoli (camundongos)	Cytodex 1	1x10 ⁵	4,46x10 ⁶	9	0,029 ± 0,0012	44,6	Shi, 2010
CMM da medula óssea (suína)	Cytodex 1	1x10 ⁵	3,6x10 ⁵	28	---	3,6	Frauenschuh, 2007
CMM da medula óssea (humana)	Cultispher G	1x10 ⁵	2,69x10 ⁵	6	0,034 ± 0,001	2,8	Sun, 2010
Linhagem de CMM (humana)	Cultispher S	1,25x10 ⁵	6,06x10 ⁷	15		9,7	Sanches, 2010
CMM da medula óssea (ratos)	Cultispher S	1,5x10 ⁷	1,24x10 ⁸	35	---	8,3	Yang, 2007
Linhagem de células pancreáticas (ratos)	Cytodex 3	1x10 ⁵	1,9x10 ⁵	4	0,26 ± 0,011	1,9	Serra, 2008
CMM da medula óssea (cabra)	Cytodex 1	4x10 ⁴	*1,2x10 ⁵	16	0,093	3,0	Schop, 2008
CMM da medula óssea (coelho)	Cytodex 1	1,21x10 ⁵	6,24x10 ⁵	14	---	5,2	Boo, 2011
CMM de orelha (ratos)	Cytodex 3	4x10 ⁴	4,5x10 ⁵	6	0,034 ± 0,004	11,25	Sart, 2010

*MC – Microcarregador; **X – Concentração celular

1.4 Cinética de crescimento das células em cultura

As CMM obedecem a uma cinética de crescimento *in vitro* semelhante a outras células de mamíferos. As fases de crescimento celular, representadas na Figura 1.8, podem ser divididas em fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log), fase estacionária e fase de declínio ou morte.

Figura 1.8 - Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.

A fase *lag* inicia-se com a inoculação das células no novo ambiente de cultivo. É um período de adaptação, que ocorre em aproximadamente 24 horas (SHI et al., 2010), onde as células não se dividem ou o fazem em baixas velocidades específicas. A duração dessa fase depende das condições do inóculo e sua densidade inicial. As culturas iniciadas em baixas densidades celulares apresentam maior duração, o que é indesejável (SUN et al., 2010).

A fase exponencial é um período onde as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. Durante essa fase, as células estão em seu melhor estado fisiológico e, portanto, ideais para os estudos de função celular.

Quando os dados relativos ao crescimento estão disponíveis, as velocidades de crescimento, de morte celular e a viabilidade são grandezas cinéticas que melhor caracterizam o estado fisiológico da população celular. É por isso que se define velocidade específica de crescimento celular (μ_x) como sendo a velocidade característica da população, que é calculada a partir da velocidade de crescimento celular, dividida pela concentração celular naquele instante, representada pela equação abaixo:

$$\mu_x = 1/X_v \cdot dX_v/dt = 1/X_v (r_x)$$

em que μ_x é velocidade específica de crescimento. A velocidade específica de crescimento pode ser calculada diretamente dos dados de concentração celular, se a viabilidade celular for elevada.

No trabalho de expansão das células murinas de Sertoli em frasco *spinner* e microcarregador Cytodex 1, a fase exponencial nas culturas agitadas durou de 5-6 dias, enquanto que nas culturas estáticas de 2-3 dias (em placas de 6 poços). As densidades celulares no final do cultivo também foram superiores nas culturas agitadas ($11,5-45,8 \times 10^5$ cels/mL nos cultivos agitados e $4,5-4,8 \times 10^5$ cels/mL nas placas de 6 poços) (SHI et al., 2010). Células mesenquimais de orelha expandidas em microcarregador Cultispher S apresentaram uma maior velocidade específica de crescimento celular (μ_{max}) quando comparada às células mesenquimais de medula óssea expandidas pelo mesmo método ($0,0338$ e $0,0117 \text{ h}^{-1}$; respectivamente) (SART; SCHNEIDER; AGATHOS, 2009). A Tabela 1.3 cita mais exemplos de valores de μ_{max} obtidos no cultivo de CMM em microcarregadores.

Na fase estacionária ocorre a escassez dos nutrientes e os produtos tóxicos estão tornando-se mais abundantes. Nessa etapa, não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Pode haver aumento relativo na síntese de proteínas especializadas em vez de proteínas estruturais, além da modificação da constituição e da carga da superfície celular (LÉO et al., 2007).

Após a fase estacionária, segue-se a fase de declínio ou morte, fase na qual a maioria das células estão em processo de morte embora outras ainda estejam se dividindo. A morte celular pode ser desencadeada pela necrose ou apoptose. A necrose é considerada um mecanismo de morte acidental, resultante da exposição a altos níveis de estresse. Já a apoptose é conhecida como morte celular programada. É resultante de níveis intermediários de estresse e ocorre mediante a ativação de um programa bioquímico caracterizado por uma série de alterações morfológicas, internamente controladas e não envolve inflamação *in vivo* (LÉO et al., 2007). Como foi demonstrado por Hewitt e colaboradores (2011), após 9 dias de cultivo as CMM de placenta humana expandidas em microcarregador Cytodex 3 se soltaram dos microcarregadores e morreram em resposta às alterações de pH, substratos e metabólitos presentes no meio de cultura

1.4.1 Metabolismo das células em cultura

O conhecimento do metabolismo de células em cultura é essencial para a formulação de um novo meio de cultura, para o planejamento de estratégias de alimentação do cultivo, para se obter alta produtividade tanto de células quanto de produto e para a produção de células destinadas à terapia.

Quando as células animais são cultivadas *in vitro*, alguns padrões gerais podem ser observados quanto ao seu metabolismo central (Figura 1.8). As duas principais fontes de energia, ATP (adenosina trifosfato), para as células animais são glicose e glutamina (GÒDIA; CAIRÓ, 2002). As CMM têm demonstrado possuir um metabolismo semelhante às linhagens de outras células animais em cultura.

Figura 1.9 - Representação simplificada do metabolismo da glicose e da glutamina em uma célula animal (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007).

Na maioria das células de mamíferos, a glicose é um dos principais nutrientes que limitam o crescimento celular e pode ser utilizada tanto por fosforilação oxidativa quanto por glicólise anaeróbia. O mecanismo de transporte de glicose para o interior da célula é a difusão facilitada, devido à diferença de concentração entre o meio intra e extracelular. Quando a glicose entra no citosol, ela é rapidamente fosforilada por hexoquinases para produzir glicose-6-fosfato (G6P) que é logo catabolizada, principalmente através de duas vias: glicólise e ciclo das pentoses fosfato (PPC). Na glicólise, a G6P é transformada em piruvato, gerando uma série de outros intermediários biossintéticos, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e duas de nicotina adenina dinucleotídeo (NADH) (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007). Através da PPC, a G6P é transformada em 6-fosfogliconato e, em seguida, a ribose-5-fosfato. Uma vez que o fluxo pelo PPC está relacionado com a síntese de ácidos nucleicos, sugeriu-se que este poderia ser controlado pelo ciclo celular (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007).

Um mol de glicose quando metabolizado por fosforilação oxidativa gera 30-38 mols de ATP e quando metabolizado pela via da glicólise anaeróbia produz 2 mols de ATP e 2 mols de lactato. Tanto o consumo de glicose quanto a produção de lactato indicam qual via metabólica as células estão utilizando para produzir energia a partir da glicose (SCHOP et al., 2009).

A glutamina é o segundo componente principal dos meios de cultura empregados para o cultivo de células de mamíferos e a principal fonte de geração de amônio. Em condições normais de cultivo a 37°C, a glutamina sofre uma decomposição química parcial a ácido pirrolidina carboxílico e amônio. Além do seu importante papel como fonte de energia para a célula, a glutamina é também um importante bloco estrutural para o metabolismo celular, sendo requerida como fonte de nitrogênio na síntese de pirimidinas e purinas, açúcares aminados, NAD⁺ e asparagina (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007). O catabolismo eficiente da glutamina utilizando GDH (glutamato desidrogenase) e oxidação completa do CO₂ resulta em 27 mols de ATP e 2 mols de NH₃ e o catabolismo ineficiente gera 1 mol NH₃ e 9 mols de ATP (utilizando GDH) ou 1 mol de alanina, 1 mol NH₃ e 9 mols de ATP (utilizando a via de transaminação) (SCHOP et al., 2009).

Em consequência da desregulação metabólica das células de mamíferos cultivadas *in vitro*, ocorre um rápido esgotamento da glicose e da glutamina, produzindo grandes quantidades de ácido láctico e íon amônio que são metabólitos

tóxicos (substâncias indesejadas ao cultivo celular). Assim, o crescimento e a viabilidade celular são prejudicados pelo progressivo esgotamento dos nutrientes e também pelo efeito negativo (inibitório ou tóxico) do acúmulo desses subprodutos (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007).

Segundo Schop e colaboradores (2008), que expandiram células mesenquimais de medula óssea de cabra em microcarregador Cytodex 1, no meio α -MEM +10% SFB, as células que possuem uma alta velocidade específica de crescimento celular consomem mais glicose e produzem mais lactato. Altas concentrações de lactato são provenientes do metabolismo “não eficiente” (glicólise anaeróbia) da glicose, porém no final do cultivo estas concentrações não atingiram valores considerados inibitórios (maiores que 28 mM). Ao contrário da glicose que ainda estava presente no último dia da cultura, a glutamina foi completamente consumida no dia 11 de cultivo e o crescimento celular foi limitado pela sua ausência.

Foi demonstrado por Shi e colaboradores (2010) em cultura de células de Sertoli murinas em microcarregador Cytodex 1, que as trocas de meio durante o cultivo são necessárias para maximizar a concentração celular, feito assim, os níveis de glicose (18,34mmol/L) e glutamina (1,12mmol/L) no meio de cultivo se mantiveram longe das concentrações limitantes para o crescimento celular, trocas parciais de meio a partir do segundo dia de cultivo maximizaram o crescimento celular quando comparado a um experimento em que não houve trocas de meio.

A Tabela 1.4 sumariza os principais trabalhos que envolvem o metabolismo das CMM.

Tabela 1.4 – Principais estudos que descrevem o metabolismo de CMM em microcarregadores

Célula	Sistema de cultivo	q gli ¹	q gln ²	Y _{lac/gli} ³	Y _{amo/gln} ⁴	Cmax am ⁵ (mM)	Cmax lac ⁶ (mM)	Referência
CMM-MO humana	Spinner/ Cultispher S	5,40	0,9	1,88	1,19	2,3	11,0	Eibes, 2010.
CMM-MO humana	Spinner/ Cultispher G	---	---	0,97	---	---	---	Sun, 2010
Linhagem de célula pancreática (ratos)	Spinner/ Cytodex 3	10,5	---	2,20	---	---	11,0	Serra, 2008
Linhagem de célula pancreática (ratos)	Biorreator/ Cytodex 3	11,1	---	1,40	---	---	14,0	Serra, 2008
CMM da medula óssea (cabra)	Estática	2,59	1,95	0,80	1,35	2,0	2,80	Schop, 2009
CMM de medula óssea (humana)	Estática	9,19	4,48	1,96	1,63	1,5	5,20	Schop, 2009

¹ q glic: velocidade específica de consumo de glicose; ² q gln: velocidade específica de consumo de glutamina; ³ Y_{lac/gli}: rendimento de lactato a partir da glicose; ⁴ Y_{amo/gln}: rendimento de amônia a partir da glutamina; ⁵ Cmax am: Concentração máxima de amônia; ⁶ Cmax lac: Concentração máxima de lactato.

2 HIPÓTESE

A tecnologia de cultivo de células animais em microcarregadores juntamente com meios de cultura e biorreatores apropriados é uma tecnologia eficiente e de custo reduzido para a expansão de células estromais mesenquimais multipotentes derivadas da medula óssea com manutenção das características funcionais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um bioprocesso de custo reduzido e eficiente para expansão de células mesenquimais estromais multipotentes derivadas da medula óssea em microcarregadores em frasco *spinner*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Cultivar as CMM da medula óssea em garrafas estáticas como condição de cultivo controle.
 - b) Cultivar as CMM-MO e CMM-VCU em frascos *spinner* utilizando microcarregadores;
 - c) Comparar a eficiência de expansão das CMM da medula óssea em garrafas estáticas e microcarregadores em relação à cinética de crescimento celular, metabolismo e custo de expansão;
 - d) Comparar a eficiência de expansão das CMM da medula óssea em garrafas estáticas e microcarregadores em relação às propriedades funcionais pós-cultivo (potencial de diferenciação, perfil imunofenotípico e propriedades imunomodulatórias);
 - e) Otimizar das condições de cultivo no microcarregador escolhido para evitar formação de agregados de células-microcarregadores e com isso, aumentar a recuperação celular.
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e encontra-se registrado sob o processo HCRP nº 1981/2009.

4.2 Materiais

4.2.1 Células mesenquimais estromais multipotentes

As células utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da medula óssea de pacientes normais (CMM-MO) e para estabelecer o método de cultivo foram utilizadas CMM da veia do cordão umbilical (CMM-VCU) de partos ocorridos entre a 37^a e 42^a semanas de desenvolvimento fetal (a termo) em função da disponibilidade do material. Após o parto, os cordões foram coletados e armazenados à 4°C em frascos de vidro estéreis contendo tampão fosfato (PBS) suplementado com 2% de glicose (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,2% de albumina (Baxter Healthcare Co, Glendale, CA, EUA). As amostras de cordão umbilical permaneceram estocadas no máximo até 12 horas antes do processamento.

As amostras de medula óssea (4 a 5 mL) foram coletadas em centro cirúrgico, da crista ilíaca superior, durante o processo de doação de células progenitoras hematopoéticas para realização de transplantes hematológicos halogênicos e foram colocadas em tubos heparinizados. As amostras foram processadas em até 6 horas após terem sido coletadas.

Os doadores foram orientados verbalmente e por escrito sobre o projeto de pesquisa, seus objetivos, riscos e justificativa, bem como os benefícios obtidos com a conclusão do estudo. O termo de consentimento necessário para a coleta do material biológico utilizado neste trabalho foi obtido de forma clara e voluntária. A identidade das pessoas envolvidas nos ensaios laboratoriais foi preservada até o término da pesquisa.

4.2.2 Meios de cultura

Para cultivo das CMM foi utilizado o meio de cultura α -MEM (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA) acrescido de 2mM/L de L-glutamina (L-Glutamine, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Penicillin – Sterptomycin, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA), 2,6 g/L de Hepes (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA) e 2,0 g/L de bicarbonato de sódio (Merck, São Paulo, SP, Brasil). O meio foi suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) (Fetal Bovine Serum Characterized - HyClone™, Logan, UT, EUA).

O meio Mesenpro RS ((Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA) também foi testado para a expansão das CMM. Este meio é composto de um meio basal líquido, acrescido de 2mM/L de L-glutamina (L-Glutamine, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA) e foi suplementado com 2% ou 15% de SFB.

4.2.3 Microcarregadores

A expansão das CMM em frasco *spinner* foi realizada utilizando os microcarregadores Cytodex 3® (GE Healthcare), P 102-L e P Plus 102L (Hyclone™).

O microcarregador Cytodex 3 possui uma matriz de dextrana e é recoberto com uma fina camada de colágeno, conforme mostrado na Figura 4.1. Suas principais características encontram-se apresentadas na Tabela abaixo.

Figura 4.1 - Representação esquemática do microcarregador Cytodex 3® (GE Healthcare)

Tabela 4.1 - Características do microcarregador Cytodex 3® (GE Healthcare)

Característica	
Densidade (g/mL)	1,04
Diâmetro (μ m)	141-211
Área aproximada (cm ² /g peso seco)	2700
Número microcarregadores/g peso seco	3,0x10 ⁶
Concentração de microcarregador utilizado (g/L)	3,0

O microcarregador P 102-L e P Plus 102-L (Hyclone™) são microcarregadores de poliestireno, ambos com densidade de 1,02 g/mL e diâmetro de 125-212µM sendo o primeiro não recoberto e o segundo com carga positiva.

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Determinação da densidade celular

A determinação da densidade das células em suspensão foi realizada por contagem em câmara de Neubauer (hemacitômetro) após diluição das amostras com solução de Turk's (corante composto de ácido acético e violeta genciana). Para minimizar os erros de contagem, foram contados oito quadrantes com aproximadamente 50-100 células (quando possível) em cada um. A média e o desvio padrão das medidas de densidade e viabilidade celular foram determinados considerando 2 eventos de contagem, sendo cada evento representado pela contagem de 4 quadrantes, utilizando o software Microsoft Excel 2003.

A densidade das células aderidas aos microcarregadores foi avaliada também através de contagem em câmara de Neubauer após a dissociação das células dos microcarregadores utilizando enzima Tryple durante 15 minutos.

Foram testadas duas outras metodologias para determinação da densidade de células aderidas: MTT e contagem de núcleos corados com violeta cristal.

A contagem dos núcleos corados com violeta cristal (PHARMACIA, 1981) foi realizada por contagem em câmara de Neubauer como acima descrito, porém as células foram colocadas no corante composto pelo ácido cítrico que lisa a células e pelo violeta cristal que cora o núcleo. A amostra foi deixada por 2 horas no banho maria à 37°C e depois agitada no vortex por 20 segundos para posterior contagem dos núcleos.

O kit baseado no MTT ou Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich, EUA) é um método colorimétrico que mensura a atividade da enzima mitocondrial desidrogenase que reduz o MTT (amarelo) ao formazan (roxo). Foi utilizado para determinar indiretamente a densidade celular dos cultivos em frasco spinner, por espectrofotometria (λ = 570-630 nm), em função da atividade mitocondrial das células vivas.

4.3.2 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo. Para isso, uma alíquota de 100µL contendo 10^5 células foi colocada em um tubo de poliestireno 12 x 75 previamente identificado. Foram adicionados 400µL de PBS e 50µL do corante iodeto de propídeo 50 mg/mL (PI, do inglês *propidium iodide*, Sigma-Aldrich) e, em seguida, a amostra foi imediatamente avaliada, utilizando o software *CELLQuest™* (Becton Dickinson, BD, San Jose, CA, USA).

4.3.3 Determinação da morte celular pelo método LDH

Para uma determinação precisa do nível de morte celular, no período de cultivo, foi realizada a análise da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada para o meio de cultura, utilizando o kit enzimático Tox-7 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). O método é baseado na redução do NAD^+ pelo LDH a 490nm e em sua conversão para um derivado de formazan vermelho pela ação de corante tetrazólio, conforme mostrado na Figura 4.2. A densidade de células mortas foi calculada a partir da relação entre a absorbância e a densidade celular determinada através de uma curva padrão de várias densidades celulares lisadas com 1% v/v de Triton por aproximadamente 1 minuto a temperatura ambiente.

Figura 4.2 – Representação esquemática das reações enzimáticas envolvidas no método da LDH.

4.3.4 Análise de glicose e ácido láctico

A determinação da concentração de glicose e ácido láctico presente nos sobrenadantes dos cultivos, foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna de resina Aminex HPX-87H (Bio-rad), fase móvel H_2SO_4 5mM, temperatura de 65°C e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ em cromatógrafo Waters com detecção através do índice de refração (W410, Waters) para glicose e UV 210 nm para ácido láctico.

4.3.5 Análise de aminoácidos

A análise dos aminoácidos presentes nos sobrenadantes dos cultivos (que foram congelados -20°C° também foi realizada CLAE, de acordo com o método proposto por Henrikson e Meredith (1984). Uma coluna pico-tag (Waters, Ireland) foi utilizada como fase estacionária e como eluente, um gradiente constituído por duas fases móveis A e B. A fase A é composta de 19 gramas de acetato de sódio tri-hidratado, 0,5mL de trietilamina, 200µL de EDTA e 1L de água purificada. Depois de feita, para cada 940mL de solução adicionar e 60 mL de acetonitrila. A fase B apenas água e acetonitrila. As condições de operação do cromatógrafo (Waters) foram: temperatura de 36 °C, tempo de corrida de 45 minutos e gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm.

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

4.3.6 Análise de amônia

As análises de amônia foram feitas nas amostras dos sobrenadantes dos cultivos utilizando eletrodo de íon seletivo. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A, foi utilizado para obter as medidas de milivoltagem. Foi preparada uma curva padrão a partir de uma solução padrão contendo amônia (cloreto de amônia – Sigma Aldrich, EUA).

4.3.7 Caracterização imunofenotípica das CMM

Na terceira passagem antes e após serem cultivadas em microcarregadores por sete dias, amostras de CMM foram analisadas em relação a seus antígenos de superfície celular, por meio de marcação com anticorpos monoclonais específicos (imunofenotipagem). Após a marcação, as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FASCalibur BD, San Jose, CA, USA) utilizando o software *CELLQuest™* (Becton Dickinson, BD, San Jose, CA, USA).

Os anticorpos monoclonais que apresentavam fluorocromos diretamente conjugados com PE (ficoeritrina) ou FITC (Isotiocianato de fluoresceína) foram utilizados como imunomarkação direta. Para a imunomarkação indireta, foram utilizados anticorpos monoclonais purificados em conjunto com anticorpos monoclonais secundários IgG de cabra, anti-camundongo conjugado com FITC.

Foi estabelecido um painel de 14 anticorpos monoclonais: CD 73-PE (SH3/SH4), HLA classe 1-PE; CD90-PE (Thy-1), CD 105-FITC (SH2), CD 146-FITC (MCAM), CD49e-PE (Integrina- α 5), CD29-PE (Integrina- β 1), CD13-PE, HLA classe II-PE, HLA-DR-FITC, CD31-FITC (PECAM), CD34-PE, CD45-FITC, CD14-PE, (BD, Beckton Dickinson).

Para a realização do controle negativo de isótopo, foi utilizado o anticorpo anti-Mouse IgG γ_1 -FITC e anti-Mouse IgG γ_2 -PE (Simultest, BD, Beckton Dickinson).

As CMM foram subdivididas em alíquotas de 100 μ L de suspensão celular em PBS na concentração de 1×10^5 células/tubo e marcadas com 1 μ g do anticorpo específico por 20 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Após a marcação, as células foram lavadas 2x com PBS e ressuspensas em 500 μ L de PBS para análise no citômetro de fluxo.

Para as imunomarcações indiretas, as CMM após a marcação com o anticorpo específico, foram incubadas com o anticorpo secundário IgG-FITC, no escuro, por 10 minutos e depois lavadas para posterior análise no citômetro. Foram analisados 10.000 eventos celulares para cada marcação imunofenotípica e os resultados foram gerados em gráficos de histograma para imunomarkação e em "Dot Plot" para definição do tamanho/granularidade internos.

4.3.8 Caracterização funcional das CMM

4.3.8.1 Potencial de diferenciação em adipócitos e osteócitos

A avaliação do potencial de diferenciação das células foi realizada antes e após o cultivo em microcarregadores para verificar se o sistema de cultivo proposto alteraria essa propriedade das CMM.

Adipócitos: A diferenciação das CMM em células tipo adipócitos foi realizada em placas de 24 poços (Greiner, Alemanha), previamente montadas com pequenas lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro (Gold Lab, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os controles negativos, ou seja, CMM indiferenciadas foram mantidos em meio convencional (α -MEM+ 7,5% SFB) sem a presença de indutores de diferenciação e sob as mesmas condições anteriormente descritas. O meio utilizado foi o α -MEM, suplementado com 15% SBF (Hyclone), 1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 2,5 mg/mL de insulina e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

As CMM indiferenciadas foram tripsinizadas e replaqueadas na concentração de 4×10^4 cel/mL para a diferenciação, e 5×10^3 cel/mL para controle negativo. O ensaio de diferenciação foi iniciado no mínimo 24h após o início do cultivo para permitir a adesão das células à lamínula e uma confluência de 50-60%.

Após alcançar a confluência desejada, o meio de cada poço foi removido e em seguida, adicionou-se 500 μ L do meio de indução de diferenciação específico para adipócito e 500 μ L do meio base, α -MEM+15% SFB. Para as amostras do controle negativo foi utilizado o meio α -MEM suplementado somente com 7,5% SFB. As placas da diferenciação foram mantidas em estufa com 80% de umidade, a 37°C com 5% de CO₂. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana, sendo que o mesmo continha o dobro da concentração de reagentes indutores da diferenciação. As amostras foram cultivadas e monitorizadas por microscopia de contraste de fase (Olympus, IX71) até o surgimento de indícios da diferenciação celular ($\pm$ 15 dias).

As culturas diferenciadas e seus controles foram fixadas com 500 μ L de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada e incubação com solução de álcool 70% por 2-3 minutos, as células foram coradas por 5 minutos com o corante específico para moléculas lipídicas, Sudam II escarlate (MERCK, Alemanha). Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com

1 mL de álcool 70%, 1 mL de água destilada e contra-coradas com 500 µL do segundo corante, hematoxilina de Harris por 2 minutos à temperatura ambiente.

Osteócitos: A metodologia de preparação das lâminas e cultivo foi semelhante à utilizada na diferenciação adipocítica. Para a diferenciação em células osteocíticas foi usado o meio α -MEM, suplementado com 7,5% SBF (Hyclone), 0,1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 20 mM de ácido ascórbico e 1 M de β -glicerolfosfato (Reagem, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As culturas e seus controles foram lavados uma vez com PBS, fixadas por 30 minutos com 500 µL de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a temperatura ambiente. A seguir as células foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas com 1 mL de solução de nitrato de prata 5% por 30 minutos, na ausência de luz. Logo depois o material foi lavado com água e exposto a intensa iluminação (lâmpada de 100w) por 1 hora e 15 minutos sobre uma superfície branca. As células foram então lavadas rapidamente com 1 mL tiosulfato de sódio 5%, água destilada e contra-coradas com 500 µL de hematoxilina de Harris por 2 minutos à temperatura ambiente.

As amostras de CMM diferenciadas foram lavadas em água corrente até o surgimento de uma coloração azulada. Após nova lavagem com água destiladas, as amostras foram submetidas ao processo de desidratação em bateria de álcool-xilol (Álcool 60%, Álcool 70%, Álcool 80%, Álcool 90%, Álcool absoluto I, Álcool absoluto II, xilol absoluto I, xilol absoluto II e xilol absoluto III) e as lâminas foram montadas em Permount SP 15 (Fisher, Inglaterra).

4.3.8.2 Potencial de inibição da proliferação de linfócitos T

O potencial de inibição da proliferação de linfócitos T das CMM foi avaliado antes e após o cultivo em microcarregador. Foram utilizadas aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células ressuspensas em 3 mL de meio α -MEM+15%SFB, ou seja, em uma concentração de 5×10^5 cel/mL.

Também foram utilizadas células mononucleares (CMN) de amostras de sangue periférico coletadas e gentilmente cedidas sempre de um mesmo doador (D^{ra} Karen de Lima Prata), colhidas na presença de heparina sódica – 14UI/mL, obtidas por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll Hypaque. Foram separadas no mínimo 2×10^7 células para marcação com CFSE (controle não marcado - 3×10^6 células).

As células foram centrifugadas e ressuspensas em 2mL de PBS+0,1% albumina humana e marcadas com 2,5 μ M de CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Molecular Probes, USA) por 10 minutos à 37°C. A marcação foi imediatamente interrompida pela adição de 5 volumes de meio RPMI+10%SFB gelado e as amostras foram incubadas por 5 min no escuro e em gelo. As células foram então lavadas 3 vezes com 20mL de RPMI+20% SFB e ressuspensas no mesmo meio na concentração desejada (5×10^5 cels/mL).

As células foram plaqueadas no período da manhã nas seguintes concentrações:

MSC controle – 1×10^5 células: 200 μ L da suspensão celular + 800 μ L meio α -MEM

MSC:CMN 1:2 - 500 μ L da suspensão celular + 500 μ L meio α -MEM

MSC:CMN 1:5 - 200 μ L da suspensão celular + 800 μ L meio α -MEM

MSC:CMN 1:10 - 100 μ L da suspensão celular + 900 μ L meio α -MEM

Estas suspensões celulares foram colocadas em uma placa de 24 poços (1mL/poço) e estimuladas com 5 μ L de PHA 1mg/mL. Os controles foram mantidos em uma placa diferente contendo poços de CMN não marcadas, CMN marcadas com CFSE e CMN marcadas com CFSE e estimuladas com PHA. O experimento foi incubado a 37°C por 5 dias no escuro (em papel alumínio, para evitar a perda da fluorescência do CFSE). Após 12-18hs foram coletados 2 poços de CMN não marcadas e 2 poços de CMN marcadas com CFSE (controle positivo da marcação no dia 1).

Ao final de 5 dias, as células foram coletadas, transferidas para tubos 12 x 75 mm e centrifugadas a 500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi marcado com 5 μ L anticorpo monoclonal anti CD3-APC e incubado por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 2mL de PBS. As amostras foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 200 μ L de PBS. As células foram adquiridas em um citômetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson). Os dados foram analisados com o *software* CELLQuest™ (Becton Dickinson).

Como controles da proliferação, foram utilizadas células não-marcadas, células marcadas com CFSE e não-estimuladas e células marcadas com CFSE, estimuladas com PHA e cultivadas sem as CMM. Foram feitas triplicatas de cada uma das condições de cultivo.

O cálculo da capacidade de inibição da proliferação dos linfócitos T pelas células mesenquimais foi feito em relação à proliferação das células estimuladas com PHA, marcadas com CFSE e cultivadas na ausência das CMM.

4.3.9 Perfil citogenético

O perfil citogenético das CMM foi avaliado após o cultivo em microcarregador. As células provenientes dos cultivos foram mantidas em garrafas estáticas até a confluência de aproximadamente 70%. Para interromper o ciclo celular na fase de metáfase, foi adicionado 100 µL do reagente colcemid (N-deacetyl-N-Methylcolchicine) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) à concentração de 0,15µg/mL. Em seguida as amostras foram mantidas na estufa com 80% de umidade, a 37°C e 5% de CO₂ durante 6 horas. Após incubação, as CMM foram tripsinizadas de forma convencional e, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, a suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL e centrifugada por 10 minutos a 800 rpm.

O sobrenadante das culturas foi removido e 5mL da solução KCl 75 mM previamente aquecida (37°C) foi adicionada ao “*pellet*” celular. As amostras foram homogeneizadas, colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos e posteriormente centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e a solução fixadora (metanol e ácido acético 3:1, Merck) foi adicionada à amostra. Foram realizadas pelo menos três “lavagens” com o fixador.

Após a fixação, com o auxílio da pipeta *Pasteur*, o material foi gotejado (aproximadamente três gotas) sobre a superfície de uma lâmina previamente lavada e mantida em água destilada. Foram preparadas pelo menos cinco lâminas de cada cultura. Depois desse processo as lâminas foram mantidas à 50°C por um período de 24h, antes de se proceder a digestão com tripsina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). O restante do material fixado foi armazenado em freezer (-20°C) para utilização futura caso haja necessidade de repetição de alguma análise.

4.3.9.1 Bandeamento das CMM

O processo de bandeamento cromossômico foi realizado com utilização de solução de tripsina (1%) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), diluída em PBS (5 e 45 mL, respectivamente). As lâminas foram imersas em solução de tripsina por um tempo de 2-8 segundos, posteriormente enxaguadas em água corrente e submetidas à coloração com Giemsa por 5 minutos. Após a coloração, as lâminas que possuíram espalhamento adequado dos cromossomos e boa qualidade de bandamento GTG (*G-banding trypsin-Giemsa*), com no mínimo 400 bandas (ideal 550 bandas) foram analisadas por meio de microscopia óptica convencional.

A varredura foi feita utilizando a objetiva de 10X e a análise com a objetiva de imersão (100X). Para cada amostra, foram capturadas pelo menos 50 (cinquenta) células em metáfase e uma delas foi analisada com auxílio do software *BANDView®EXPO* (*Applied Spectral Imaging*). Os cariótipos foram descritos de acordo com os critérios internacionais de nomenclatura cromossômica (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature* - ISCN, 2009).

4.3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O crescimento das CMM no microcarregador Cytodex 3, ao longo do cultivo, também foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura.

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 3%, pós fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratação em série crescente de álcoois 950-100, sendo que a secagem foi realizada em aparelho ponto crítico BALZER 20. As amostras foram metalizadas com ouro por sputting no aparelho EMITECH K550 e analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP do Programa de Pós-Graduação da FMVZ-US pela especialista de laboratório Dra Rose Eli Grassi Rici, do departamento de Cirurgia da USP- São Paulo, sob orientação da Professora Maria Angélica Miglino.

4.4 Procedimentos Experimentais

O procedimento experimental adotado nos experimentos encontra-se apresentado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Representação esquemática do procedimento experimental adotado durante a realização do trabalho.

4.4.1 Isolamento das CMM

As células mononucleares da medula óssea foram isoladas por centrifugação em gradiente de *Ficoll-PaqueTM Plus* (Histopaque-1077, GE HealthCare BioSciences, Upsala, Suécia) de densidade 1077 g/mL conforme descrito a seguir. Após centrifugação de 30 minutos o anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado e transferido para outro tubo. Em seguida essas células foram lavadas mais duas vezes PBS 1X acrescido de 0,6% de ACD.

O *pellet* foi ressuspenso em 1-5 mL de meio de cultura α -MEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Nova York, EUA) para determinação da densidade celular em câmara de *Neubauer*.

As CMN foram então plaqueadas em garrafas de cultura de 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) contendo 15 mL de meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de SFB na concentração de $0,6 \times 10^6$ células/mL (1,3 –

$4,0 \times 10^5$ cel/cm²) e isoladas por aderência ao plástico. As culturas foram mantidas em incubadora com 85% de umidade a 37°C e 5% de CO₂.

As células da veia do cordão umbilical foram isoladas a partir de amostras de cordão umbilical humano. Cada amostra coletada foi lavada individualmente com 20 mL de PBS por duas vezes. Logo depois uma das extremidades do cordão foi cortada e, com o auxílio de uma cânula, a veia umbilical foi longitudinalmente canulada. A extremidade oposta da veia umbilical foi clampada com o uso de material cirúrgico adequado. Por meio de uma seringa, uma solução de colagenase (5 mg/mL) do tipo IA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi injetada pela cânula até o preenchimento de todo interior da veia. A parte superior do cordão umbilical foi também foi clampada.

Após a retirada da cânula, o cordão foi transferido para um frasco estéril contendo PBS com 2% de glicose e 0,2% de albumina, e colocado em banho-maria à 37°C por 20-30 minutos. Após o período de digestão enzimática para o desprendimento celular, o cordão umbilical foi novamente canulado e colocado sob uma superfície estéril. Logo em seguida foi adicionado meio *RPMI* com 5% SBF para a inativação da enzima colagenase e lavagem do lúmen da veia do cordão. Essa suspensão celular foi centrifugada e as células que se destacaram do vaso, foram plaqueadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² contendo 15 ml de meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de SBF.

Após 3 a 7 dias de cultivo, houve a troca de todo o meio, para retirar as células que não estavam aderidas à garrafa, tanto das culturas de células da medula óssea como das células do cordão umbilical. Passado esse período inicial, o meio foi trocado uma a duas vezes a cada 7 dias e a cultura celular mantida até a confluência celular de 80 a 100% quando as células foram então tripsinizadas com o uso de tripsina recombinante, Tryple (Invitrogen).

Após a tripsinização, alíquotas de 2×10^5 células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² em 15 mL de meio α -MEM 15% SFB. A cada processo de tripsinização contou-se uma passagem. As células foram expandidas em 3 ou 4 garrafas de 75cm² para que na 3ª ou 4ª passagem fosse obtido o número de células suficientes ($6,25 \cdot 10^6$) para inocular o frasco *spinner* (Techne, Reino Unido).

4.4.2 Preservação e descongelamento das células

Alíquotas de aproximadamente $1-3 \times 10^6$ CMM foram criopreservadas em meio de constituído de 90% de SBF inativado e 10% de DMSO. Para tal, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* celular ressuspensado no meio de congelamento. A suspensão celular foi distribuída em tubos criogênicos de 2,0mL (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha), congelada a 80° C negativos por no mínimo 24 horas e, em seguida, transferida para o nitrogênio líquido.

Uma semana antes de cada experimento em frasco *spinner*, as células foram descongeladas em banho-maria a 37° C, ressuspensas em RPMI com 5% de SBF e centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm. A seguir foram ressuspensas em meio α -MEM+15% SFB. Todo o processo de criopreservação e descongelamento foi realizado em banho de gelo e com soluções e centrifuga a temperatura entre 6 e 12° C.

4.4.3 Cultivo em garrafas estáticas

Para a expansão em condições estáticas, foram utilizados frascos de cultura de poliestireno (frascos T) com área superficial de 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) contendo 15 mL de meio de cultura e células na concentração de $1,33 \times 10^4$ cel/mL. Os frascos foram mantidos em atmosfera úmida (85%) a 37 °C e 5% de CO₂.

4.4.4 Cultivo em microcarregador e frasco *spinner*

As etapas de preparação dos microcarregadores, hidratação, lavagem e esterilização, foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Depois de obtida a concentração de células adequada através do cultivo em garrafas estáticas, as células foram inoculadas nas concentrações de $5,0 \times 10^4$ ou $1,25 \times 10^5$ cel/mL, de acordo com o objetivo do experimento, no frasco *spinner* de 125mL contendo 1/3 do volume final de meio de cultura (50mL) e microcarregadores nas concentrações de 2,0 ou 3,0 g/L.

Nas primeiras 6 horas do cultivo além da utilização de 1/3 do volume final, a agitação foi mantida intermitente, isto é, agitação de 30 rpm por 2 minutos intercalado pelo período de repouso de 30 minutos, para a adaptação das células ao

novo ambiente de crescimento. Para avaliar a adesão das células aos microcarregadores, durante este período foram retiradas amostras a cada hora e determinada a densidade de células em suspensão e a viabilidade.

Passado este período de 6 horas, o volume foi completado e a agitação mantida constante a 50 rpm durante o restante do período experimental. As trocas do meio de cultura foram realizadas diariamente após o segundo dia de cultivo até o final do experimento, sendo trocado 50% do volume de trabalho. Diariamente foram retiradas amostras para avaliação do crescimento e metabolismo celular (glicose, glutamina, ácido láctico e amônia).

Os frascos *spinner* foram mantidos em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 85% de umidade sob um agitador magnético (Techne, Reino Unido).

Após 7 dias de cultivo, as células foram coletadas, lavadas 2x com PBS através de centrifugação a 800rpm por 10min sem aceleração e sem breque para não danificar os microcarregadores e as células. O *pellet* foi então ressuspenso em 15-20mL de Tryple por 10-15min para quantificar o crescimento celular.

Após a recuperação celular, as células foram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo, submetidas ao ensaio de capacidade de diferenciação em osteócitos, adipócitos, ensaio de inibição da proliferação de linfócitos e perfil citogenético. Todos esses procedimentos também foram realizados antes do cultivo em frasco *spinner*.

4.5 Metodologia de Análise dos Resultados

Para caracterizar o crescimento e o metabolismo celular durante os cultivos da CMM em microcarregadores e em garrafas estáticas foram avaliadas as densidades máximas de células aderidas produzidas por mL de meio de cultura e parâmetros de cultivo como:

- constante de adesão celular, k_a (h⁻¹);
 - velocidade específica máxima de crescimento celular, $\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹);
 - tempo de duplicação, t_d (h);
 - rendimento aparente de lactato a partir da glicose, $Y_{\text{lac/gli}}$ (mM lactato/mM glicose);
 - rendimento aparente de amônia a partir da glutamina, $Y_{\text{amo/gln}}$ (mM amônia/mM glutamina);
-

- velocidade específica de consumo de glicose, q_{gli} (pmol/cel.dia);
- velocidade específica de consumo de glutamina, q_{gln} (pmol/cel.dia)

A constante de adesão da célula ao microcarregador (k_a) foi determinada durante as primeiras 6 horas de cultivo, assumindo comportamento de 1ª ordem, de acordo com Ng *et al* (1995). A adesão da célula ao microcarregador foi monitorada através da diminuição da densidade de células em suspensão.

A taxa de desaparecimento de células na suspensão foi determinada através da equação 1.1, que ao ser integrada resulta na seguinte expressão logarítmica representada pela equação 1.2.

$$\frac{dX}{dt} = -k_a \cdot X \quad (1.1)$$

$$\ln\left(\frac{X_t}{X_0}\right) = -k_a \cdot t \quad (1.2)$$

onde: X_t – densidade de células em suspensão no tempo t , cel.mL⁻¹

X_0 – densidade inicial de células em suspensão, cel.mL⁻¹

k_a – constante de adesão, h⁻¹

Logo, a constante k_a pode ser determinada pela tangente da linha reta de $\ln(X_t/X_0)$ em função do tempo. O valor de k_a é interpretado como a taxa específica de adesão.

Para a determinação da velocidade específica de crescimento celular máxima, foi utilizada a seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1.3)$$

onde: μ - velocidade específica de crescimento, h⁻¹

X - concentração de células, cel.mL⁻¹

t – tempo, h

Na fase exponencial de crescimento da célula podemos considerar que:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = cte = \mu_{máx} \quad (1.4)$$

Integrando esta equação da concentração inicial de células X_0 a uma concentração X num intervalo de tempo t , temos que,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{máx} \cdot t \quad (1.5)$$

Nesta expressão, o valor de $\mu_{máx}$ é o coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo.

Uma vez determinado o valor de $\mu_{\max}$, é possível determinar o tempo de duplicação (t_d) na fase de crescimento exponencial através da equação abaixo:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (1.6)$$

A melhor maneira de caracterizar o metabolismo celular é através de suas velocidades de consumo e produção de metabólitos, ambas referidas a uma quantidade padrão de células (10^6 células). Mais conhecidos como coeficiente metabólicos, estes parâmetros facilitam a comparação de várias linhagens de células e diferentes condições de cultivo, além de identificar mudanças nos caminhos metabólicos em relação ao tempo e em resposta a alterações das condições de cultivo.

O rendimento aparente de lactato a partir da glicose, $Y_{\text{lac/gli}}$, estima à fração de glicose que foi convertida a lactato pela glicólise.

$$Y_{\text{lac/gli}} = \frac{\Delta_{\text{lac}}}{\Delta_{\text{gli}}} \quad (1.7)$$

onde Δ_{lac} é a variação da concentração de lactato e Δ_{gli} é a variação da concentração de glicose, ambas medidas determinadas na fase de crescimento exponencial e no período entre as trocas de meio de cultura.

O rendimento de lactato a partir da glicose é aparente, pois lactato pode ser produzido através do metabolismo de outros substratos, como a glutamina e também pelo fato do piruvato como produto da glicólise poder ser convertido em outros compostos como alanina, por exemplo. O máximo rendimento teórico é 2, pois apenas 2 moléculas de lactato podem ser formadas a partir de 1 molécula de glicose. No entanto, produção de lactato a partir da glutamina pode resultar em rendimentos superiores a 2 (Doyle, 1998).

O rendimento de amônia a partir da glutamina, $Y_{\text{amo/gln}}$ foi determinada de maneira igual a $Y_{\text{lac/gli}}$.

As velocidades específicas de consumo de consumo de glicose (q_{gli}) e glutamina (q_{gln}) foram determinadas através das equações abaixo, durante a fase de crescimento exponencial no período entre cada troca de meio:

$$q_{gli} = \frac{\mu_{\max}}{e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1} \cdot \frac{C_{gli}(t) - C_{gli}(t-1)}{X(t)} \quad (4.8)$$

$$q_{g \ln} = \frac{\mu_{\max}}{e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1} \cdot \frac{C_{g \ln}(t) - C_{g \ln}(t-1)}{X(t)} \quad (4.9)$$

onde: $C_{gli}(t)$ é a concentração de glicose no tempo t (mM), $C_{gli}(t-1)$ a concentração de glicose no dia anterior após a troca de meio de cultura e $X(t)$ a densidade de células aderidas no tempo t .

Para análise da diferença estatística na expressão dos marcadores de superfície pré e pós *spinner*, crescimento celular em garrafas estáticas e frasco *spinner* foi utilizado o teste de MannWhitney, método não paramétrico e não pareado.

Para análise da inibição da proliferação de linfócitos foi utilizado o teste Wilcoxon, um método não paramétrico para amostras pareadas.

5 RESULTADOS

5.1 Estudos preliminares para seleção de condições de cultivo

No momento em que este trabalho foi proposto não havia na literatura dados referentes à expansão de células mesenquimais estromais multipotentes humanas em microcarregadores, portanto, a primeira etapa deste trabalho foi focada na seleção de condições de cultivo que promovessem um crescimento celular satisfatório. Além disso, foram também avaliadas diversas metodologias para garantir o correto acompanhamento deste crescimento celular. Esta primeira etapa foi realizada com células derivadas da parede da veia umbilical (CMM-VCU) em função da maior disponibilidade. A utilização de CMM derivadas da medula óssea (CMM-MO) nesta etapa preliminar seria pouco indicada, por se tratar de material biológico precioso e de difícil obtenção. Abaixo encontram-se citadas as condições selecionadas.

Para a definição do microcarregador utilizado neste trabalho, além de ser observados os principais microcarregadores descritos na literatura, foram avaliados o microcarregador de dextrana recoberto com colágeno Cytodex 3 (GE Healthcare) e dois novos microcarregadores de poliestireno desenvolvidos para o cultivo em condições livres de proteínas animais: P102L e PPlus102L (Hyclone). Nas condições estudadas, houve crescimento celular apenas no microcarregador Cytodex 3. Nos demais microcarregadores, houve morte celular intensa já nas primeiras horas de cultivo. Em função disso, foi dada continuidade a este trabalho utilizando o microcarregador Cytodex 3.

A concentração de microcarregadores (2,0 e 3,0 g/L) e de inóculo ($5,0 \times 10^3$; $7,5 \times 10^3$ cel/cm²), bem como a adição de microcarregadores ao longo do cultivo também foram avaliadas. O melhor crescimento celular foi obtido com a concentração de Cytodex 3 de 3,0 g/L e de inóculo $1,5 \times 10^4$ cel/cm². A adição de microcarregadores ao longo do cultivo, apesar de aumentar o crescimento celular em função do aumento da área para o crescimento, resultou na formação de agregados de células e microcarregadores de tamanho superior aos agregados obtidos sem a adição. Observou-se que ao invés das células colonizarem as novas partículas, as partículas adicionadas aderiram ao aglomerado já formado

aumentando ainda mais o seu tamanho. Este fato inviabilizou uma recuperação satisfatória das células ao final do cultivo.

Ainda com o intuito de selecionar condições de cultivo satisfatórias foram testados 3 diferentes formulações de meio de cultivo: α -MEM suplementado com 15% de SFB e MesenPRO RSTM suplementado com 2% e 15% de SFB. O meio MesenPRO RSTM (Invitrogen) é uma nova formulação que foi desenvolvida para cultivo de CMM em baixas concentrações de SFB (2%). Entretanto, não foi possível estabelecer o crescimento de CMM-VCU nesta formulação tanto em garrafas estáticas quanto em microcarregadores e frascos *spinner*. Com uma suplementação semelhante à utilizada no meio α -MEM, 15%, foi observado crescimento, mas o mesmo foi inferior ao obtido no meio α -MEM. Portanto, as próximas etapas deste trabalho foram realizadas com o meio α -MEM suplementado com 15% de SFB.

Como o objetivo deste trabalho está voltado ao desenvolvimento de um bioprocessamento que permita a expansão de CMM com adequada qualidade terapêutica, a etapa de recuperação celular pós-cultivo é de extrema importância. Para isso, foram avaliadas diferentes metodologias de dissociação das células do microcarregador. A enzima colagenase foi testada nas concentrações de 5 e 10 mg/mL durante 30min e 40min. A dissociação com a enzima tripsina 0,05% foi realizada por 30 minutos e a dissociação com as enzimas colagenase e pronase 0,5mg/mL durante 30min e 40min. Também foi utilizada uma tripsina recombinante (Tryple[®], Invitrogen) durante 10, 15 e 30 min. Por microscopia ótica foi possível observar que apenas a metodologia empregando a enzima Tryple[®] durante 15 minutos resultou na completa dissociação das células das partículas de microcarregador. Além disso, a viabilidade celular após a dissociação foi superior a 90%.

Outra importante condição definida para garantir uma recuperação celular pós-cultivo satisfatória foi limitar a fase de crescimento para 7 dias. Tempos superiores a 7 dias, apesar de resultarem em um maior crescimento celular, levaram a formação de agregados de células e microcarregadores maiores e mais densos, impossibilitando uma determinação confiável da densidade de células aderidas e a recuperação de células viáveis. Em função disso, os demais experimentos deste trabalho foram finalizados com 7 dias de cultivo.

Uma vez definida as principais condições de cultivo, uma análise comparativa do crescimento de CMM derivadas da veia do cordão e de CMM derivadas da medula óssea foi realizada. A intenção foi verificar se as condições acima selecionadas seriam adequadas para o crescimento de CMM-MO.

Conforme mostrado na Figura 5.1, o crescimento celular foi superior nas células derivadas da medula óssea. Ao final dos cultivos (n=3 de cada), a densidade máxima de células aderidas foi de $4,7 \times 10^5$ cel/mL para a CMM-MO e $2,03 \times 10^5$ cel/mL para CMM-VCU ($p=0,1$ no quinto, sexto e sétimos dia de cultivo). Com isto, foi verificado que as condições definidas anteriormente também foram satisfatórias para o crescimento das células derivadas da medula óssea e foi dada continuidade a este trabalho com a caracterização da cinética de crescimento e do metabolismo das células e avaliação das características funcionais pós cultivo.

Figura 5.1– Crescimento de células derivadas da medula óssea (CMM-MO) e da veia do cordão umbilical (CMM-VCU) em microcarregador Cytodex 3. Os cultivos foram realizados com um inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, 3,0 g/L de Cytodex 3 a 37° e 50 rpm, com trocas diárias de 50% de meio a partir do segundo dia. Os resultados representam a média de 3 diferentes cultivos.

5.2 Expansão de CMM no microcarregador Cytodex3 em frascos *spinner* para avaliação da cinética de crescimento e recuperação de células funcionais

5.2.1 Cinética de crescimento celular

5.2.1.1 Adesão das células às partículas de microcarregadores

O período de adesão da célula ao microcarregador compreendeu as seis primeiras horas de cultivo em frasco *spinner*. Neste período, a agitação foi mantida de forma intermitente para adaptação das CMM ao novo sistema de cultivo, uma vez que as células eram provenientes de uma cultura estática. Foram realizados ciclos de agitação à 30rpm por um período de 2 minutos intercalados com um período de repouso de 30 minutos. Durante a adesão, amostras do sobrenadante foram retiradas de hora em hora, para a determinação da densidade de células em suspensão e com isso estimar a adesão das células aos microcarregadores. O volume de trabalho neste período foi mantido em 17,0 mL, isto é, 1/3 do volume do cultivo total, para aumentar a densidade celular e a concentração de partículas e com isso aumentar a probabilidade de contato, favorecendo a adesão.

Como pode ser observado na Figura 5.2, a densidade de células em suspensão foi gradativamente diminuindo à medida que o período de cultivo aumentava. A contagem inicial teve uma média de $3,3 \times 10^5$ células/mL ($n=10$). Após 2 horas 84,7% das células já não estavam mais em suspensão. Ao final de 6 horas, 92% das células inoculadas já não se encontravam mais em suspensão. Para avaliar se o desaparecimento das células em suspensão foi proveniente da adesão aos microcarregadores ou devido à morte celular, um novo cultivo foi realizado analisando tanto a densidade de células em suspensão quanto à morte celular quantificada por LDH. A Figura 5.3 apresenta os resultados deste cultivo.

A morte celular foi baixa durante as primeiras 3 horas de cultivo, quando houve a adesão mais intensa das células. Após a quarta hora de cultivo, a densidade de células mortas atingiu aproximadamente 3×10^4 células/mL, valor que também pode ser considerado baixo. Como a morte celular foi baixa, a constante de adesão da célula à partícula de microcarregador (k_a) pode ser estimada considerando uma cinética de primeira ordem nas duas primeiras horas de cultivo (NG; BARRY; BUTLER, 1996): $0,939 \pm 0,031 \text{ h}^{-1}$ ($R=0,999$).

Figura 5.2.- Células em suspensão durante as 6 primeiras horas de cultivo. O período de adesão foi realizado em frascos *spinner* de 125 mL com um volume de trabalho de 17 mL (1/3 do volume final), sob agitação intermitente a 30 rpm por 2 minutos a cada 30 minutos em 3,0g/L de Cytodex 3. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 10 amostras diferentes de CMM de medula óssea bem como seus respectivos desvios padrão (barras verticais).

Figura 5.3.- Densidade de células em suspensão e de células mortas durante o período de adesão da CMM-MO2 ao microcarregador Cytodex 3. O período de adesão foi realizado em frascos *spinner* de 125 mL com um volume de trabalho de 17 mL (1/3 do volume final), sob agitação intermitente a 30 rpm por 2 minutos a cada 30 minutos em 3,0g/L de Cytodex 3.

5.2.1.2 Crescimento celular

Após o período de adesão, o cultivo teve seu meio completado para o volume final de 50 mL e a agitação foi mantida constante a 50 rpm durante 7 dias. A Figura 5.4 apresenta o perfil de crescimento celular obtido neste período. A célula exibiu uma cinética de crescimento celular semelhante a outras linhagens de células de mamífero em cultura.

Figura 5.4 – Crescimento das CMM cultivadas em microcarregador Cytodex 3. As células foram cultivadas em frascos *spinner* de 125 mL com um volume de trabalho de 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% de SFB, a 50 rpm e 37°C. Foi utilizada uma concentração de microcarregadores de 3,0 g/L e de células de $1,25 \times 10^5$ cel/mL. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 10 amostras diferentes de CMM de medula óssea. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

Após a fase lag de 24 horas, foi observado o crescimento exponencial até o quarto dia de cultura apresentando uma velocidade específica máxima de crescimento celular, $\mu_{\max}$ de $0,027 (\pm 0,0002) \text{ h}^{-1}$ ($n=10$). Esta velocidade específica máxima de crescimento celular corresponde a um tempo de duplicação de 25,7 horas. A célula continuou o crescimento até o sétimo dia, atingindo uma densidade máxima de $4,86 \times 10^5 \text{ cel/mL}$, o que representa uma expansão média de 3,9 vezes, considerando o número de células inoculadas. No entanto, se for considerada a densidade de células aderidas no primeiro dia de cultivo ($1,85 \times 10^4 \text{ cel/mL}$), a expansão foi de 26,3 vezes. Foi observada que a densidade de células aderidas no primeiro dia de cultivo não correspondeu a densidade de células inoculadas ($1,25 \times 10^5 \text{ cel/mL}$). No entanto, não foi observada morte celular significativa neste

período (Figura 5.5), o que poderia justificar o desaparecimento das células. A morte celular atingiu valores máximos no segundo dia de cultivo, $5,15 \times 10^4$ cel/mL, quando não houve troca de meio, e no último dia, $5,24 \times 10^4$ cel/mL. Além disso, também não foi observada, uma grande quantidade de células em suspensão.

Figura 5.5– Densidade de células aderidas, células mortas e suspensão celular durante 7 dias de cultivo em frasco *spinner* de 125 mL com um volume de trabalho de 50mL de meio α -MEM suplementado com 15% de SFB, a 50 rpm e 37°C. CMM-MO2 com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, 3,0 g/L de Cytodex 3.

O pH foi monitorado diariamente ao longo dos primeiros cultivos realizados, não sendo observadas mudanças drásticas de seu valor, devido as trocas diárias de meio de cultura. Abaixo encontram-se apresentados a média da evolução do pH durante o cultivo de 3 amostras de CMM-MO (2, 5 e 6). O pH inicial no primeiro dia de cultivo teve um valor médio de 7,32, enquanto que no último dia este valor foi de 7,08. Isso se deve ao aumento da densidade celular e consequente liberação de metabólitos para o meio de cultivo.

Figura 5.6 - Evolução pH durante os 7 dias de cultivo em frasco *spinner* com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, 3,0 g/L de Cytodex 3 e meio α -MEM suplementados com 15% de SFB. As células foram cultivadas a 37°C e 50 rpm (n=3).

As Figuras 5.7e 5.8 mostram a evolução do crescimento celular ao longo do cultivo, por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. É possível observar que a formação de agregados é iniciada no quinto dia de cultivo e no sétimo dia, estes agregados possuem maior tamanho e densidade.

Figura 5.7 – Microscopia de contraste de fase das células CMM-MO5 ao longo do cultivo em microcarregador Cytodex 3 rpm.

Figura 18 – Microscopia eletrônica de varredura das CMM-MO2 aderidas ao microcarregador Cytodex 3 ao longo do cultivo.

O crescimento no microcarregador Cytodex 3 em frasco *spinner* pode ser comparado à metodologia de cultivo em garrafas estáticas realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto para a produção das CMM-MO que vem sendo infundidas nos pacientes. Vale ressaltar que os dois sistemas de cultivo foram comparados partindo de diferentes densidades de células por cm^2 de área disponível, pois objetivou-se comparar as condições de crescimento em microcarregador determinadas neste trabalho com as condições já estabelecidas no Hemocentro para o cultivo das células em garrafas estáticas. Outra diferença entre as duas metodologias é que no frasco *spinner*, 50% do meio foi trocado diariamente a partir do segundo dia e nas garrafas estáticas o meio de cultura foi 50% renovado apenas no terceiro dia.

Nos experimentos utilizando microcarregadores havia 405 cm^2 de área disponível e uma densidade de inóculo de $1,5 \times 10^4 \text{ cel/cm}^2$ enquanto que nas garrafas estáticas a área disponível foi de 25 cm^2 e a densidade de inóculo de $2,0 \times 10^3 \text{ cel/cm}^2$. Devido à discrepância entre a quantidade de células inoculadas e a quantidade de células aderidas no primeiro dia de cultivo no microcarregador, a comparação do crescimento nos dois sistemas foi realizada a partir do primeiro dia e

não em relação à densidade de células inoculadas. O cultivo em microcarregador partiu de uma densidade de células aderidas de $2,28 \times 10^3$ cel/cm² (dia 1) e atingiu $5,54 \times 10^4$ cel/cm² (dia 7), ou seja, uma expansão de 24,3 vezes, conforme pode ser observado na Figura 5.9 (n=10). Já em garrafas estáticas (n=7), a densidade de células aderidas no primeiro dia foi de $6,29 \times 10^3$ cel/cm² e no sétimo dia foi de $3,31 \times 10^4$ cel/cm², ou seja, uma expansão de 5,3 vezes.

Figura 5.9 - Expansão das CMM-MO no microcarregador Cytodex3 e em garrafa estática. As células cresceram em garrafas estáticas de 25cm² com inóculo inicial de 2×10^3 cels/cm² e foram sacrificadas diariamente. Em frascos *spinner* com inóculo inicial de $1,5 \times 10^4$ cel/cm² com 3,0g/L de Cytodex 3. Ambos os cultivos foram realizados em meio α -MEM suplementado com 15% de SFB a 37°C. O asterisco no gráfico mostra o ponto experimental onde foi verificada diferença estatística.

5.2.2 Metabolismo celular

O consumo dos substratos glicose e glutamina, bem como a produção dos subprodutos tóxicos como ácido lático e amônia foram acompanhados durante todos os cultivos para caracterizar o metabolismo celular e assegurar um ambiente com adequada qualidade nutricional para o crescimento das células. O perfil de concentração dos substratos e subprodutos durante o cultivo em microcarregador e em garrafa estática, bem como o consumo de glicose e glutamina e produção de ácido lático e amônia encontram-se apresentados nas Figuras abaixo.

Figura 5.10 - Concentração de glicose (A) e glutamina (B) durante o cultivo realizado em microcarregador Cytodex 3 em frasco *spinner* e em garrafa estática com meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. As linhas verticais indicam o momento onde houve troca de meio de cultura.

Figura 5.11 – Consumo de glicose (A) e glutamina (B) acumulados durante o cultivo realizado em microcarregador Cytodex3 em frasco *spinner* e em garrafa estática com meio α -MEM suplementado com 15% de SFB.

No cultivo em microcarregador, 50% do meio foi trocado diariamente a partir do segundo dia, para auxiliar a manutenção do pH em valores próximos ao valor ótimo 7,3 e também para prevenir a exaustão de nutrientes chaves limitantes do crescimento celular ou a formação de subprodutos tóxicos em concentrações inibitórias. Adotando este procedimento de cultivo, foi possível prevenir a exaustão de glicose, que no sétimo dia de cultivo atingiu a menor concentração, 2,1 mM. Na garrafa estática, onde o meio foi trocado (50%) apenas no terceiro dia, também não houve exaustão da glicose, e a menor concentração, 3,85 mM, ocorreu também no

final do cultivo. Em função da maior densidade celular no cultivo realizado em microcarregadores, o consumo de glicose foi consideravelmente superior quando comparado ao consumo obtido no cultivo em garrafas estáticas. Ao final de sete dias de cultivo foram consumidos 17,6 mM de glicose nos microcarregadores e 4,7 mM na garrafa estática.

Assim como a glicose, a glutamina também não foi totalmente consumida nos dois sistemas de cultivo. A concentração residual no sétimo dia de cultivo foi de aproximadamente 1,8mM para ambos os sistemas, independente das diferentes trocas de meio realizadas. O consumo de glutamina também foi semelhante atingindo 1,6 mM nos microcarregadores e 1,5 mM na garrafa estática.

Figura 5.12 - Concentração de ácido láctico (A) e amônia (B) durante o cultivo realizado em microcarregador Cytodex 3 em frasco *spinner* e em garrafa estática com meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. As linhas verticais indicam o momento onde houve troca de meio de cultura.

Figura 5.13 - Produção de ácido láctico (A) e amônia (B) acumulados durante o cultivo realizado em microcarregador Cytodex3 em frasco *spinner* e em garrafa estática com meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. As linhas verticais indicam o momento onde houve troca de meio de cultura.

Considerando a concentração do subproduto ácido láctico, observou-se um aumento gradativo ao longo do cultivo. Na cultura estática devido à troca de meio somente no terceiro dia, chegou-se a concentração de 14,81 mM no sétimo dia de cultivo. No cultivo em microcarregador as trocas diárias de meio após o segundo dia fizeram com que a concentração de ácido láctico não ultrapassasse a média 15,22mM no quinto dia de cultivo. Como esperado, a produção de ácido láctico foi superior no cultivo em microcarregadores, proveniente do maior consumo de glicose.

A concentração de amônia atingiu seu valor máximo de 0,73 mM no quinto dia na garrafa estática e 1,09 mM no sétimo dia de cultivo nos microcarregadores. Os perfis de produção de amônia foram semelhantes nos dois cultivos em função dos consumos também semelhantes de glutamina.

Na Tabela 5.1 encontram-se apresentados os parâmetros metabólicos determinados durante a fase de crescimento exponencial nos dois sistemas de cultivo. Em função do maior crescimento e da maior disponibilidade de nutrientes no cultivo com microcarregadores como consequência do maior número de trocas de meio (5 trocas de 50% do meio) em comparação ao cultivo com garrafas estáticas (1 troca de 100% do meio) os parâmetros metabólicos foram superiores no cultivo em microcarregadores.

Tabela 5.1. Parâmetros metabólicos determinados na fase de crescimento exponencial para CMM cultivadas em microcarregadores e em garrafas estáticas.

Sistema de cultivo	$Y_{lac/gli}^1$ (mM/mM)	$Y_{amo/gln}^2$ (mM/mM)	q_{gli}^3 (pmol/cel.dia)	q_{gln}^4 (pmol/cel.dia)
Microcarregador	1,2	1,4	15,0	1,0
Garrafa estática	0,9	0,8	5,2	0,7

¹ $Y_{lac/gli}$: rendimento de lactato a partir da glicose; ² $Y_{amo/gln}$: rendimento de amônia a partir da glutamina; ³ q_{gli} : velocidade específica de consumo de glicose; ⁴ q_{gln} : velocidade específica de consumo de glutamina

Figura 5.14 – Perfil da concentração de aminoácidos na cultura estática (A) e spinner (B) durante os 7 dias de cultivo. No spinner foram realizadas trocas diárias de meio a partir do segundo dia e na estática houve troca de 50% do meio apenas no terceiro dia.

O consumo de aminoácidos também foi acompanhado durante os cultivos realizados. Como pode ser observado na Figura 5.14 não houve exaustão de nenhum aminoácido analisado em ambos os sistemas de cultivo. Além disso, o

consumo destes aminoácidos também pode ser considerado baixo nos dois sistemas.

5.2.3 Recuperação celular pós-cultivo

Como o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um bioprocesso para expansão de CMM, não apenas o crescimento e o metabolismo celular devem ser avaliados, mas também a possibilidade de recuperação da maior quantidade de células com alta viabilidade e funcionalidade. Em função disso, as células foram dissociadas dos microcarregadores no sétimo dia de cultivo em frasco *spinner* com auxílio da enzima Tryple, conforme definido anteriormente. A média de recuperação após a padronização da dissociação celular foi de 78,8% em 8 amostras e a viabilidade em média $94,91 \pm 2,58\%$ conforme pode ser observado na Figura 5.15. O número de células teórico foi estimado em uma amostra de 1mL retirada antes do término do experimento, enquanto que o número de células recuperadas foi determinado após a contagem da densidade celular após a tripsinização de todo o volume de cultivo.

Figura 5.15 - Recuperação celular utilizando a enzima tryple após cultivo em microcarregador Cytodex3 e frasco *spinner* com meio α -MEM suplementado com 15% de SFB.

As CMM-MO foram expandidas durante 10 dias em dois dos dez cultivos realizados. Nesses cultivos, em função do maior tempo, houve a formação de aglomerados de células e microcarregadores de maior tamanho, o que dificultou a recuperação final. A média de recuperação dessas 2 amostras foi estimada em

23,5%. Isto se deve ao fato de tanto na amostra quanto no experimento não foi houve dissociação celular total. Esse fato exemplifica o motivo pelo qual foi decidido interromper o cultivo no sétimo dia ao invés de mantê-lo por um maior período de tempo.

5.2.4 Avaliação imunofenotípica e funcional pós cultivo

5.2.4.1 Imunofenotipagem

A expressão antigênica das proteínas de superfície das CMM-MO foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados encontrados demonstram que as células cultivadas em garrafas estáticas e as células recuperadas ao final do cultivo em microcarregador possuem características imunofenotípicas compatíveis com as das CMM, isto é, expressão baixa ou ausente dos marcadores de células hematopoéticas (CD14, CD45), endoteliais (CD31) e HLA-DR e expressão significativa dos antígenos CD90, CD73, CD105, CD146, CD49e e HLA-ABC. Após análise estatística apenas o CD73 ($p=0,048$) e CD146 ($p=0,018$) tiveram alterações significantes antes e após o cultivo em frasco *spinner*. Os resultados encontrados (porcentagem de células que expressam os marcadores) estão representados graficamente na Figura 5.16.

Figura 5.16 – Principais marcadores imunofenotípicos das CMM pré e pós cultivo em microcarregadores com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL e 3,0 g/L de Cytodex 3. As células foram mantidas a 37° e 50 rpm, com trocas diárias de 50% de meio a partir do segundo dia. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 10 amostras de CMM-MO. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

5.2.4.2 Diferenciação

As CMM provenientes do cultivo em garrafa estática (pré) e pós cultivo em microcarregadores foram induzidas à diferenciação em adipócitos e osteócitos. A diferenciação em adipócitos começou a ser evidenciada morfologicamente por volta do 10º dia de indução, quando as gotículas de gordura começaram a surgir, aumentando de número e tamanho com o passar dos dias. A avaliação das lâminas pré e pós cultivo observadas após a coloração com sudan II-escarlata evidenciou uma boa diferenciação em todas as amostras analisadas. A diferenciação morfológica em osteócitos começou a ser evidenciada por volta de 15 dias após o início do cultivo em meio indutor. Em todas as amostras houve a diferenciação. Não houve diferença morfológica na intensidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos nas células pré e pós cultivo (Figura 5.17).

Figura 5.17 – Diferenciação das células em adipócitos e osteócitos pré (garrafas estáticas) e pós cultivo em microcarregador Cytodex 3 com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL e 3,0 g/L de microcarregador. Os cultivos foram mantidos a 37° e 50 rpm, com trocas diárias de 50% do meio indutor a partir do segundo dia.

5.2.4.3 Inibição da proliferação de linfócitos

Células provenientes de 5 cultivos pré e pós *spinner* foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da proliferação de linfócitos. As células foram plaqueadas em paralelo e após 4 horas foram colocadas sobre elas as células mononucleares de sangue periférico (CMN-SP) marcadas com CFSE. As células foram então estimuladas com PHA (5µg/mL) e incubadas por 5 dias no escuro à 37°C. A capacidade de inibição da proliferação de linfócitos T pelas CMM foi calculada com base nos resultados observados no grupo controle, de CMN-SP estimuladas, cultivadas pelo mesmo período na ausência de CMM. Após análise em citômetro de fluxo, foi observado que as CMM não perdiam a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos *in vitro* após serem cultivadas em microcarregadores, nas diversas concentrações testadas. Conforme mostrado na Tabela 5.2 e Figura 5.18, na

diluição 1:2 em média 81,45%, e 88,27% das células foram inibidas de proliferar nas amostras pré e pós cultivo, respectivamente ($p=0,06$). Na diluição 1:5 em média 66,4%, e 78,03% ($p=0,03$) e na diluição 1:10, 56,22%, e 65,58% ($p=0,06$) pré e pós cultivo, respectivamente.

Tabela 5.2 – Inibição da proliferação de linfócitos da CMM-MO

Pré <i>spinner</i>	CMM-MO6	CMM-MO2	CMM-MO8	CMM-MO7	CMM-MO11
MSC:PBMC 1:2 + PHA	86,54	82,31	80,62	83,82	73,95
MSC:PBMC 1:5 + PHA	73,57	66,35	60,65	61,31	70,02
MSC:PBMC 1:10 + PHA	52,15	48,48	58,71	48,66	73,10

Pós <i>spinner</i>	CMM-MO6	CMM-MO2	CMM-MO8	CMM-MO7	CMM-MO11
MSC:PBMC 1:2 + PHA	88,97	90,42	93,46	89,49	79,00
MSC:PBMC 1:5 + PHA	77,26	71,99	82,84	74,38	83,70
MSC:PBMC 1:10 + PHA	61,32	68,42	64,15	49,33	84,70

Figura 5.18 – Inibição da proliferação de linfócitos pelas CMM-MO pré e pós cultivo em frasco *spinner*.

5.2.5 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada em um total de 5 amostras pós cultivo em microcarregador. O intuito de realizar essa análise foi demonstrar que após a CMM ser submetida ao novo sistema de cultivo ela não sofria nenhuma alteração genética que pudesse, quando infundida em pacientes, causar algum dano à saúde do receptor. A análise de 50 metáfases em cada amostra mostrou a ausência de

anomalias cromossômicas clonais, conforme mostrado na Figura 5.19. Apenas uma das amostras apresentou uma quebra de cromossomo do grupo C, que pode estar relacionado à artefato da técnica utilizada.

Figura 5.19 - Cariótipo da CMM-MO2 pós cultivo em frasco *spinner*.

5.2.6 Estimativa de custo dos consumíveis durante o processo de expansão

A estimativa do custo da expansão nos dois sistemas de cultivo foi realizada levando-se em consideração que as CMM já haviam sido expandidas e congeladas. Para a produção de $1,5-2,0 \times 10^8$ células em 7 dias de cultivo em garrafa estática são necessárias 40 garrafas de 175cm^2 , 3,5L de meio α -MEM suplementado com 15% de SFB (para plaquear e trocar após 3 dias de cultivo), em média 200 pipetas e 50 tubos falcon, 320mL de tripsina, 1,6L de PBS e 1L de RPMI suplementado com 5% de SFB para inativar a tripsina. O gasto total é aproximadamente 1500 reais, conforme mostra a tabela a seguir.

Para a produção de $1,5-2,0 \times 10^8$ de células, utilizamos no descongelamento inicialmente 10 garrafas estáticas, um frasco *spinner* que é autoclavável (material permanente), e um total de 1,5L de meio α -MEM suplementado com 15% de SFB, 50 pipetas, 7 tubos falcon, 220mL de tripsina, 1,2L de PBS, 660mL de RPMI suplementado com 5% de SFB, com um gasto de aproximadamente 800 reais, conforme mostrado a seguir.

Tabela 5.3 - Custo estimado do cultivo em garrafas estáticas para produção de $1,5-2 \times 10^8$ células (setembro/2011).

Fase	Material	Unidade	Pct/frasco/unid (R\$)
Descongelamento	Garrafas	40	250
	Meio a-mem	1400mL	395,43
	Meio troca	1120mL	316,34
	Pipeta	5	3,9
	Tubo	2	1,35
Tripsinização	Pipetas	200	200
	PBS1x	1600mL	1,79
	Tripsina	320mL	124,8
	RPMI+ 5%	960mL	140,98
	Tubos 50mL	40	30
Valor total infusão 40 garrafas 175cm²			1464,59

Tabela 5.4 – Custo estimado do cultivo em microcarregador para produção de $1,5-2 \cdot 10^8$ células (setembro/2011).

	Material	Unidade	Pct/frasco/unid (R\$)
Descongelamento	Garrafas	10	62,5
	Meio a-mem	350mL	98,9
	Pipeta	5	3,75
	Tubo	2	1,35
Tripsinização Estática	Pipetas	40	30
	PBS1x	200mL	0,22
	Tripsina	70mL	27,6
	RPMI+ 5%	210mL	30,83
	Tubos 50mL	5	3,35
Troca meio spinner	Meio a-mem	1.250 mL	353,06
	PBS1x	1000 mL	1,12
	Tripsina	150mL	59,1
	RPMI+ 5%	450mL	66,08
	Tubos 50mL	10	6,7
	Microcarregador	1,65g	47,4
Valor total 1,5-2.108cél			791,96

A tecnologia de cultivo em microcarregadores, portanto, possibilita não só uma expansão eficiente com manutenção das características funcionais pós-cultivo mas

também com custo reduzido. Vale lembrar que para a produção em larga escala será utilizado um biorreator que permitirá o controle de condições de cultivo como oxigênio dissolvido e pH. Em função deste controle de pH, não será necessárias tantas trocas de meio de cultura, o que diminuirá em aproximadamente 46% do custo de expansão.

5.3 Otimização das condições de cultivo visando aumento da recuperação celular.

Ao longo dos experimentos realizados para a determinação da cinética de crescimento das células no microcarregador Cytodex 3, foi observado que a principal limitação da tecnologia era a dificuldade de recuperação das células ao final do cultivo devido à intensa formação de agregados de células e microcarregadores. Em função disto, objetivou-se nesta etapa do trabalho a otimização de algumas condições de cultivo para diminuir a formação destes agregados. Abaixo, encontram-se descritas as condições utilizadas para tal finalidade.

5.3.1 Velocidade de agitação

Com o objetivo de evitar a intensa formação de agregados de células e microcarregadores desde o início do cultivo, uma das estratégias avaliadas foi o aumento gradativo da velocidade de agitação. Os experimentos foram realizados com CMM-MO5 em terceira passagem. A velocidade de agitação no experimento controle foi mantida constante a 50 rpm durante todo o cultivo e no experimento teste foram aumentadas de maneira gradativa: 50rpm nos dias 1 e 2, 60 rpm no dia 3, 70 rpm no dia 4 e 80 rpm dias 5, 6, e 7. O comportamento celular diante dessas alterações de velocidade encontra-se apresentados na figura abaixo.

Figura 5.20 – Crescimento celular em função do aumento gradativo da agitação. A amostra refere-se a CMM-MO5 em terceira passagem, em 2 spinners diferentes cultivadas em 3,0g/L de Cytodex 3 em meio α -MEM suplementado com 15% de SFB.

A densidade máxima de células (dia 7) foi de $3,6 \times 10^5$ cel/mL no experimento controle e $1,3 \times 10^5$ cel/mL no experimento sob agitação gradativa, ou seja, 2,8 vezes maior no experimento controle. A densidade de células na suspensão permaneceu baixa durante todo o período de cultivo.

Houve recuperação de 100% das células aderidas aos microcarregadores tanto no experimento controle como no teste, que foi constatada por microscopia óptica após dissociação celular. Foram produzidas $9,0 \times 10^6$ células no *spinner* teste, em que houve aumento gradativo da velocidade e $1,93 \times 10^7$ células no experimento controle com velocidade constante.

Figura 5.21 – Efeito do aumento gradativo da velocidade de agitação no crescimento celular e na formação de agregados. **A**-controle (sem alteração de velocidade). **B**- com aumento gradativo da velocidade de agitação do terceiro ao quinto dia. As figuras acima são CMM-MO5 em terceira passagem, em 2 *spinners* diferentes cultivadas durante 7 dias com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, 3,0 g/L de Cytodex 3. As células foram mantidas a 37° e 50 rpm, com trocas diárias de 50% de meio a partir do segundo dia.

5.3.2 Condições de adesão

Considerando que a etapa de adesão da célula ao microcarregador é uma etapa determinante de um bom crescimento celular, somado ao fato de que foram observados nos experimentos realizados, agregados de células e microcarregadores já nos primeiros dias de cultivo, objetivou-se avaliar se diferentes condições durante a fase de adesão celular teriam influência na formação de agregados e no crescimento celular durante o cultivo. Este conjunto de experimentos também teve como objetivo avaliar se diferentes condições de adesão promoveriam uma menor morte celular no início do cultivo.

Foram realizados experimentos com quatro diferentes condições (n=2). As condições de adesão dos cultivos controle (condição 1) foram similares as utilizadas anteriormente (agitação intermitente a 30 rpm por 2 minutos intercalados com 30 minutos de repouso, volume inicial de trabalho de 17 mL). Nos demais cultivos, foi utilizado o volume de trabalho inicial de 50mL durante a etapa de adesão, com o intuito de promover uma distribuição mais uniforme das células nas partículas de microcarregadores, além das diferentes condições de agitação. Na condição 2, a agitação intermitente foi mantida considerando 30 segundos em repouso e 30 segundos sob agitação a 30 rpm. Já na condição 3 a agitação intermitente foi de 2 minutos sob agitação a 30 rpm, seguida de 30 segundos em repouso. Na condição 4 houve suplementação com 0,1% de Pluronic F-68, objetivando diminuir uma possível morte celular durante a adesão, pois esse reagente é um estabilizador de membrana contra tensão de cisalhamento. As condições de adesão foram 2 minutos sob agitação a 30 rpm, seguida de 30 segundos em repouso com volume inicial de 50mL.

Os resultados referentes as etapas de adesão e crescimento encontram-se apresentados na Figura 5.22 A e B e Tabela 5.5.

Figura 5.22- Avaliação do efeito de diferentes condições de cultivo na adesão e no crescimento celular. Todos os experimentos foram realizados em 3,0g/L de Cytodex 3 e meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. **Condição 1** - Volume inicial de cultivo e 17 mL e agitação intermitente de 2min, 30min em repouso. **Condição 2** - Volume inicial de 50mL e agitação intermitente de 2min, 30min em repouso. **Condição 3** - Volume inicial de 50mL e agitação intermitente de 30 segundos, 30min em repouso. **Condição 4** - Volume inicial de 50mL, agitação intermitente de 2min, 30min em repouso e adição de 0,1% de Pluronic®.

Tabela 5.5 - Adesão e crescimento celular nas diferentes condições estudadas na avaliação de diferentes condições de cultivo na adesão e no crescimento celular.

Condição	% Células em suspensão		$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$X_{\max}$ (cel/mL)	Recuperação (%)	Viabilidade (%)
	2 horas	6 horas				
Condição 1	6	3,6	0,025±0,0015	3,8x10 ⁵	86,4	95,77
Condição 2	7,9	5,3	0,025±0,0029	2,8x10 ⁵	100	94,25
Condição 3	16,2	5,4	0,028±0,0029	2,7x10 ⁵	87,3	96,64
Condição 4	28,1	25	0,027±0,0031	3,2x10 ⁵	88,8	95,58

A adesão das células nas diferentes condições de cultivo não foi semelhante. Após 6 horas de cultivo 3,6%, 5,3%, 5,4% e 25% (condição 1, 2, 3 e 4, respectivamente) ainda estavam em suspensão. Isso indica que foi na condição controle que houve maior adesão celular aos microcarregadores.

O crescimento celular aparentemente apresentou o mesmo comportamento nos testes realizados. A densidade celular máxima atingida na condição 1 foi 3,8x10⁵

cel/mL, $2,8 \times 10^5$ cel/mL na condição 2, $2,7 \times 10^5$ cel/mL na condição 3 e $3,2 \times 10^5$ cel/mL na condição 4 e seus respectivos $\mu_{\max}$ foram, $0,025 \pm 0,0015$, $0,025 \pm 0,0029$, $0,028 \pm 0,0029$, $0,027 \pm 0,0031$. Em todas as condições o número de células na suspensão foi baixo durante todo o cultivo. A porcentagem de recuperação celular foi maior que 86% e a viabilidade pós-recuperação maior que 94% em todas as condições testadas.

5.3.3 Cultivos sucessivos

Este conjunto de experimentos foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de cultivos sucessivos com agitação constante e gradativa no crescimento celular e na formação de agregados.

Nesses experimentos foi utilizada a CMM-MO5. A fase de adesão teve comportamento similar ao descrito no item 5.2.1.1. No experimento controle com agitação contínua, as células foram tripsinizadas no sétimo dia de experimento e reinoculadas em *spinner* de 250 mL com 3,0 g/L de Cytodex 3, com volume final de trabalho de 100 mL e agitação contínua de 50rpm. Foram realizadas trocas diárias de meio de cultura do segundo ao sétimo e a partir do nono dia de cultivo. A densidade celular máxima atingida foi no décimo quarto dia de experimento, $6,6 \times 10^5$ cel/mL com uma recuperação de $1,54 \times 10^7$ células, ou seja, uma recuperação de 23%, considerada não satisfatória.

No experimento com aumento gradativo da agitação, as trocas de meio foram realizadas no segundo, terceiro e quarto dia. Os aumentos da velocidade de agitação foram os seguintes: 60rpm no terceiro dia, 70 rpm no quarto dia e 80 rpm no quinto dia. No quinto dia de experimento as células foram dissociadas e colocadas novamente em cultura em um *spinner* de 250mL, com um volume final de trabalho de 100ml e agitação constante de 80rpm. Nesse experimento a densidade celular máxima atingida foi no oitavo dia $9,75 \times 10^4$ cel/mL. A densidade celular no décimo dia foi $8,5 \times 10^4$ células/mL e houve uma recuperação de aproximadamente 69% das células, o que equivale a $5,85 \times 10^6$ células totais. Aparentemente as CMM sofreram muito ao voltar para o cultivo com agitação de 80rpm e não aderiram totalmente, não havendo um crescimento significativo pós aumento de escala.

Figura 5.23 – Crescimento celular com cultivos subsequentes e aumento gradativo da agitação. Os experimentos foram realizados com CMM-MO5 em terceira passagem, cultivadas num primeiro momento em *spinner* de 125 mL com 50 mL de volume de trabalho e depois em *spinner* de 250mL com 100 mL de volume de trabalho. Foi utilizada nos experimentos uma concentração de inóculo de $1,25 \times 10^5$ cel/mL e 3,0g/L de Cytodex 3 em meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. As setas indicam o dia do aumento de escala.

6 DISCUSSÃO

Foi demonstrado neste trabalho que a expansão de CMM utilizando a tecnologia de cultivo em microcarregadores foi eficiente para a produção de células com qualidade terapêutica. Esta tecnologia possibilitou uma expansão eficaz em termos de custo e capacidade de crescimento, bem como, em termos da manutenção das características funcionais pós cultivo.

Este estudo foi realizado em função da necessidade de produção destas células em larga escala com correta qualidade terapêutica. Esta necessidade é decorrente do crescente número de aplicações clínicas envolvendo as CMM.

A expansão em garrafas de cultura estáticas é a tecnologia padrão e a mais utilizada para a expansão das CMM para uso clínico. No entanto, apesar da eficácia, este tipo de cultura não permite uma produção em larga escala e com custo efetivo. Além disso, traz como desvantagens a excessiva manipulação que pode interferir nas propriedades funcionais das células; maior risco de contaminação; inexistência do controle dos parâmetros de cultivo e tempo prolongado de cultivo para a geração da quantidade adequada de células (SCHOP et al., 2008).

A tecnologia de cultivo em microcarregadores vem sendo considerada como a mais promissora em termos de produção de células pluripotentes e estromais multipotentes de grau clínico em larga escala. Este tipo de cultura oferece a vantagem de prover uma grande área para crescimento celular em um sistema em suspensão homogênea, facilita a transferência de oxigênio e CO₂, além disso, o sistema pode ter suas condições de cultivo (pH, agitação, concentração de nutrientes) monitoradas e controladas diariamente se o cultivo for realizado em biorreatores.

Diversos trabalhos foram publicados relatando a expansão satisfatória de CMM humanas (EIBES et al., 2010; SUN et al., 2010, HEWITT et al., 2011), murinas (SHI et al., 2010, , YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007, SART et al., 2009, SERRA et al., 2008), de coelho (BOO, et al., 2011), de cabra (SCHOP et al., 2008), porco (FRAUENSCHUH et al., 2007) e células embrionárias (ABRANCHES et al, 2007, FERNANDES et al., 2007; FERNANDES et al., 2009, NIE et al., 2009). No entanto, no momento em que este trabalho foi proposto não havia informação da literatura relacionada à expansão de CMM humanas em microcarregadores. Em função disso, a primeira etapa deste trabalho foi desenvolvida com o intuito de selecionar, de

maneira rápida, materiais (microcarregador e meio de cultura) e condições de cultivo que possibilitassem uma expansão e recuperação celular pós-cultivo satisfatória. Foram utilizados como referência, materiais e condições estabelecidas para a expansão de CMM de origem murina (FERNANDES et al., 2007; FRAUENSCHUH et al., 2007; YANG et al., 2007).

Dentre os microcarregadores testados (P102-L, PPlus 102-L e Cytodex 3), nas condições avaliadas, o Cytodex 3 foi o único onde foi observado crescimento celular. Em função disso e como o mesmo já vinha sendo utilizado com sucesso nos trabalhos relacionados descritos na literatura (FERANANDES et al, 2009, HEWITT et al., 2011, FRAUENSCHUH et al., 2007, SERRA et al., 2008), a utilização do mesmo foi mantida durante todo o presente projeto. As condições que resultaram em um crescimento celular satisfatório foram: concentração de microcarregador Cytodex 3 de 3,0 g/L, concentração de inóculo de $1,25 \times 10^5$ cel/mL e meio de cultivo α -MEM suplementado com 15% de SFB. Serra e colaboradores (2008) também utilizaram o microcarregador Cytodex 3, 3,0g/L e densidade celular inicial de 1×10^5 cel/mL para expansão de células pancreáticas de rato e Boo e colaboradores (2011) utilizaram a densidade celular de $1,2 \times 10^5$ cel/mL e 3,0 g/L de Cytodex 1 para expansão de CMM-MO de coelho.

Uma vez que o Hemocentro de Ribeirão Preto realiza a expansão de CMM derivadas da medula óssea para infusão em pacientes pertencentes a estudos clínicos e considerando que o objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de um bioprocesso que permita a produção das mesmas em larga escala para aplicação na própria instituição, a continuidade deste trabalho empregando-se as CMM-MO fez-se necessária. Em função disso, foi avaliada se as condições anteriormente determinadas para CMM-VCU seriam adequadas também para a obtenção de um crescimento e recuperação satisfatório das CMM-MO.

De fato, as condições selecionadas foram adequadas à expansão de CMM-MO, pois foi possível obter uma densidade celular máxima de $4,7 \times 10^5$ cel/mL no sétimo dia de cultivo para as células CMM-MO (n=3), enquanto que empregando CMM-VCU (n=3) a densidade máxima de $1,48 \times 10^5$ cel/mL também no sétimo dia de cultivo foi obtida. Apesar das inúmeras vantagens da utilização de células isoladas da parede da veia do cordão umbilical, tais como procedimento de coleta não invasivo, indolor e sem qualquer risco para a mãe ou para o bebê, grande acessibilidade para estocagem, disponibilidade imediata, procedimento ético, visto

que o cordão é descartado após o nascimento do bebê, as CMM-MO ainda são as mais utilizadas e as células que obtêm melhores resultados.

Uma vez definido condições satisfatórias, a segunda etapa do trabalho foi realizada para caracterizar a cinética de crescimento e o metabolismo celular e avaliar a recuperação, funcionalidade e características imunofenotípicas das células expandidas nos microcarregadores comparando células expandidas em garrafas estáticas.

O processo de adesão é crítico e essencial para as células dependentes de ancoramento, e mais importante ainda para células que serão submetidas à cultivos agitados. Se houver uma fraca adesão das células aos microcarregadores, elas não irão resistir às forças de cisalhamento provenientes da agitação mecânica do sistema de cultivo (YANG et al., 2007). O período de adesão da célula ao microcarregador compreendeu as seis primeiras horas de cultivo em frasco *spinner*. O volume de trabalho neste período foi mantido em 17,0 mL, isto é, 1/3 do volume do cultivo total para aumentar a densidade celular, a concentração de partículas e com isso aumentar a probabilidade de contato, favorecendo a adesão. A contagem inicial teve uma média de $3,3 \times 10^5$ cel/mL (n=10). Após 2 horas 84,7% das células já não estavam mais em suspensão e ao final de 6 horas, 92% das células inoculadas não se encontravam mais em suspensão. De maneira semelhante, Serra e colaboradores (2008) mostraram que após 4 horas de cultivo 87,5% das CMM pancreáticas de rato estavam aderidas ao microcarregador Cytodex 3 e Frauenschuh e colaboradores (2007) mostraram que 80% das CMM de porco aderiram em 3 horas no microcarregador Cytodex 1.

Conforme citado anteriormente, a maioria dos trabalhos mostra uma elevada eficiência de adesão. No entanto, esta eficiência é sempre determinada através da quantificação ou do número de células viáveis em suspensão ou número de células viáveis aderidas. Poucos trabalhos avaliam a morte celular neste período, através de metodologias específicas. Schop e colaboradores (2008) relataram uma eficiência de adesão de 41% durante o cultivo de células mesenquimais de cabra no microcarregador Cytodex 1. Este parâmetro foi determinado considerando tanto células viáveis determinadas pelo método de alamarBlue quanto células mortas determinadas pelo LDH liberado no sobrenadante, que ao final do período de adesão, representaram aproximadamente 44% das células inoculadas. Foi observado neste trabalho, desenvolvido no Hemocentro de Ribeirão Preto, que

apesar da alta taxa de desaparecimento das células em suspensão, a densidade de células aderidas no final do período de adesão e após 24 horas de cultivo, não correspondia ao número de células inoculadas. Levando isso em consideração e as descobertas realizadas por Schop e colaboradores (2008), o acompanhamento da morte celular, por LDH, durante o período de adesão também foi realizado. Ao contrário do esperado, a morte celular avaliada pela liberação de LDH no sobrenadante durante as primeiras horas de cultivo permaneceu em níveis relativamente baixos, atingindo seu valor máximo, $3,05 \times 10^4$ cel/mL, 5 horas após a adesão. Esta densidade de células mortas representou 24% das células inoculadas. A metodologia utilizada neste trabalho para acompanhar a adesão celular, apesar de levar em consideração tanto células viáveis e não viáveis, parece não ser suficiente para justificar os valores discrepantes entre o número de células inoculadas e o número de células aderidas em 24 horas. Uma das possíveis explicações é a degradação do LDH que está sendo liberado pelas células mortas. De acordo com Schop e colaboradores (2008), a atividade da enzima diminui com o passar do tempo ($t_{1/2 \text{ vida}}=9$ horas).

A célula exibiu uma cinética de crescimento celular semelhante à outras linhagens de células de mamífero em cultura. Após uma fase *lag* de aproximadamente 24 horas, foi observado o crescimento exponencial até o quarto dia de cultura. A célula apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento celular, μ_{max} , de $0,027 (\pm 0,0002) \text{ h}^{-1}$ e um tempo de duplicação de 25,7 horas. A célula continuou o crescimento até o sétimo dia, atingindo uma densidade máxima de $4,86 \times 10^5$ cel/mL, o que representa uma expansão média de 3,9 vezes, considerando o número de células inoculadas. No entanto, se for considerada a densidade de células aderidas no primeiro dia de cultivo ($1,85 \times 10^4$ cel/mL), a expansão foi de 26,3 vezes.

Segundo Shi e colaboradores (2010) que cultivaram células de Sertoli murinas em microcarregador Cytodex 3, neste sistema de cultivo, a fase *lag* ocorre nas primeiras 24 horas, pois há uma diminuição no número de células causado pela adaptação das células ao novo sistema de cultivo. Essa queda da densidade celular é mais acentuada nas culturas agitadas possivelmente em razão da baixa colonização dos microcarregadores e agitação das células não aderidas, que acabam morrendo em função da tensão de cisalhamento. Esta observação ajudaria a explicar o que foi observado nos experimentos realizados neste trabalho, onde o

número de células aderidas no primeiro dia de cultivo foi consideravelmente inferior ao número de células inoculado, caso tivéssemos observado morte celular significativa por LDH.

Um nível de crescimento celular semelhantes foi obtido por Eibes e colaboradores (2010) no cultivo de CMM humanas no microcarregador Cultispher S e no meio Mesenpro RS 2% SFB. Após 8 dias de cultivo, uma densidade celular de $4,2 \times 10^5$ cel/mL foi obtida. Já de acordo com Boo e colaboradores (2011), que partiram da mesma densidade de inóculo utilizada neste trabalho, $1,2 \times 10^5$ células/mL, em 14 dias de cultivo foram produzidas $6,24 \times 10^5$ células/mL. A fase de crescimento exponencial foi observada do sétimo ao décimo dia de cultivo e a fase estacionária do décimo ao décimo quarto dia. Os autores utilizaram CMM-MO de coelho em microcarregador Cytodex 1.

Serra e colaboradores (2008) partiram de um inóculo de 1×10^5 células/mL e em quatro dias obtiveram $1,9 \times 10^5$ células/mL. Considerando as células inoculadas que aderiram aos microcarregadores, houve uma expansão de apenas 2,2 vezes.

Shi e colaboradores (2010) também observaram uma fase lag de 24 horas, no entanto, partindo de um inóculo 1×10^5 células/mL obtiveram uma densidade celular máxima de $4,58 \times 10^6$ células/mL no sexto dia de cultivo. Os autores compararam o crescimento em microcarregador com o crescimento em placas de cultura, onde foram obtidas $4,8 \times 10^5$ células/mL a partir do mesmo inóculo. A densidade de células em relação a área de crescimento (cel/cm^2) foi sempre superior no cultivo em microcarregador quando comparado às culturas estáticas (3,38 e $1,84 \times 10^5$ células/ cm^2 , respectivamente), evidenciando que as células de Sertoli crescem camada sob camada nos microcarregadores. Nos experimentos realizados com CMM-MO realizados neste trabalho também foi observado o mesmo comportamento, uma maior produção de células por cm^2 nos microcarregadores quando comparada às garrafas estáticas ($5,54$ e $3,31 \times 10^4$ células/ cm^2 , respectivamente).

A velocidade específica de crescimento máxima obtida neste trabalho, $0,027 \text{ h}^{-1}$ é semelhante à obtida em trabalhos presentes na literatura. Valores de μ_{max} iguais a $0,029 \text{ h}^{-1}$ foram obtidos para células de Sertoli (SHI et al., 2010); $0,034 \text{ h}^{-1}$ para CMM humanas (SUN et al., 2010), $0,034 \text{ h}^{-1}$ para células mesenquimais provenientes de orelhas de ratos (SART et al., 2010) e $0,02 \text{ h}^{-1}$ para CMM humanas, $0,03 \text{ h}^{-1}$ para CMM de cabra e $0,025 \text{ h}^{-1}$ para CMM de rato (SCHOP et al., 2009).

A produção média em frasco *spinner* (n=10) foi de aproximadamente $4,9 \times 10^5$ cel/mL. Como o sistema utilizado permite o escalonamento, se utilizássemos um biorreator de 1L, seria possível a produção de aproximadamente 5×10^8 células que seriam suficientes para tratar mais de 3 pacientes de até 70Kg na dose de 2×10^6 células/Kg. Para expansão da mesma quantidade de células na forma tradicional seriam necessárias 135 garrafas de 175 cm² com um custo total de expansão duas vezes superior à estimativa do custo de expansão utilizando microcarregadores.

O conhecimento do metabolismo das células em cultura é essencial para se obter altas produtividades tanto de células quanto de produtos. O consumo dos substratos glicose e glutamina, bem como a produção dos subprodutos, como ácido láctico e amônia foram acompanhados durante todos os cultivos para caracterizar o metabolismo celular e assegurar um ambiente com adequada qualidade nutricional para o crescimento das células, prevenindo a exaustão de nutrientes chaves limitantes do crescimento celular ou a formação de subprodutos tóxicos em concentrações inibitórias.

Através das trocas diárias de 50% do meio de cultura a partir do segundo dia, foi possível prevenir a exaustão de glicose, que no sétimo dia de cultivo atingiu a menor concentração, 2,1 mM. Na garrafa estática, onde o meio foi trocado (50%) apenas no terceiro dia, também não houve exaustão da glicose, e a menor concentração, 3,85 mM, ocorreu também no final do cultivo. Ao final de sete dias de cultivo foram consumidos 17,6 mM de glicose nos microcarregadores e 4,7 mM na garrafa estática. Esse maior consumo no cultivo em microcarregadores é proveniente tanto pela maior disponibilidade de nutrientes proporcionada pelo maior número de trocas como pelo maior crescimento celular.

Outros trabalhos da literatura também mostram que a glicose não é totalmente consumida em 7 dias de cultivo. Segundo Eibes e colaboradores (2010) a glicose esgotou a partir do oitavo dia e em Serra e colaboradores (2008) no nono dia. Ambos os trabalhos realizaram trocas parciais do meio de cultura. No cultivo realizado por Shi e colaboradores (2010) em meio D-MEM com alta concentração de glicose, a menor concentração observada foi de 15 mM.

Lactato foi formado de forma gradativa nos cultivos em função do consumo de glicose. Na cultura estática devido à troca de meio somente no terceiro dia, chegou-se a concentração de 14,81 mM no sétimo dia de cultivo. No cultivo em microcarregador as trocas diárias de meio após o segundo dia fizeram com que a

concentração de ácido láctico não ultrapassasse a média 15,22mM no quinto dia de cultivo. Como esperado, a produção de ácido láctico foi superior no cultivo em microcarregadores, proveniente do maior consumo de glicose. As concentrações máximas de lactato verificadas neste trabalho foram semelhantes às reportadas na literatura para crescimento de CMM em microcarregadores: 11 mM (EIBES et al., 2010); 13,4 mM (SHI et al., 2010) e ficaram abaixo do valor considerado inibitório para células-tronco mesenquimais de 28,0 mM (SCHOP et al., 2008.).

O rendimento de lactato a partir da glicose ($Y_{lac/gli}$) e o consumo específico de glicose (q_{gli}) foram determinados na fase de crescimento exponencial a partir dos dados de concentração de glicose e lactato entre as trocas de meios realizadas. Estes parâmetros também foram superiores nos cultivos em microcarregadores ($Y_{lac/gli} = 1,2$ e $0,9$ mM/mM e $q_{gli}=15,0$ e $5,2$ pmol/cel/dia nos microcarregadores e garrafas estáticas respectivamente). Novamente atribuímos este fato a maior disponibilidade de nutrientes e ao maior crescimento obtido no cultivo em microcarregadores. Valores de $Y_{lac/gli}$ superiores a 2 podem indicar que a glicose está sendo consumida via glicólise e não de maneira eficiente através da fosforilação oxidativa. Neste trabalho, não foram obtidos valores de $Y_{lac/gli}$ superiores a 2,0 indicando o metabolismo eficiente da glicose. Através do cultivo de CMM-MO humanas em garrafas estáticas, Schop e colaboradores (2009) encontraram valores de $Y_{lac/gli}$ e q_{gli} na faixa de 1,77- 2,13 mM/mM e 7,10-11,47 pmol/cel.dia, respectivamente. Em outro trabalho do mesmo grupo (SCHOP et al., 2008) realizado no microcarregador Cytodex 1, os valores de $Y_{lac/gli}$ e q_{gli} ficaram na faixa de 0,96- 2,00 mM/mM e 4,28-8,5 pmol/cel.dia, na região de crescimento exponencial.

A glutamina é o segundo componente principal dos meios de cultura empregados para o cultivo de células de mamíferos e a principal fonte de geração de amônio. Ela também não foi totalmente consumida nos dois sistemas de cultivo. A concentração residual no sétimo dia de cultivo foi de aproximadamente 1,8mM para ambos os sistemas, independente das diferentes trocas de meio realizadas. O consumo de glutamina também foi semelhante atingindo 1,6 mM nos microcarregadores e 1,5 mM na garrafa estática. Ao contrário das células de mamíferos, a glutamina não parece ser um substrato limitante para CMM. Eibes e colaboradores (2010) iniciaram o cultivo com aproximadamente 1,9mM, no décimo dia de cultivo a concentração era 1mM e no vigésimo 0,3mM. Em Shi e colaboradores (2010) a glutamina não baixou de 1mM. O consumo específico de

glutamina (q_{gln}) foi consideravelmente inferior ao de glicose: 1,0 e 0,7 pmol/cel/dia nos cultivos em microcarregadores e garrafas estáticas, respectivamente. Em garrafas estáticas, SCHOP e colaboradores (2009) obtiveram valores próximos a zero quando consideraram no cálculo de consumo a degradação espontânea da glutamina (em torno de 10% por dia).

Assim como a glutamina, os demais aminoácidos não foram consideravelmente consumidos ao longo do cultivo, conforme mostrado na Figura 5.14. Shi e colaboradores (2010) também relataram que não houve diferenças nas concentrações finais de aminoácidos, exceto para o glutamato, proveniente do metabolismo da glutamina e da alanina que é resultado da transferência de um grupo amina para o piruvato.

A amônia, um subproduto da glutamina, de maneira geral, tem efeitos mais danosos para células em cultura do que o ácido láctico. Valores acima de 3mM são considerados tóxicos (FERNANDES *et al.*, 2007, SCHOP *et al.*, 2009). A concentração de amônia dos cultivos analisados atingiu seu valor máximo de 0,73 mM no quinto dia na garrafa estática e 1,09 mM no sétimo dia de cultivo nos microcarregadores. No trabalho publicado por Shi e colaboradores (2010) a amônia atingiu 4mM após 7 dias de cultivo, o que pode ter sido um fator determinante para que as células de Sertoli entrassem na fase estacionária. O rendimento da amônia a partir da glutamina, $Y_{\text{amo/gln}}$, 1,4 e 0,8 pmol/cel/dia (microcarregadores e garrafas estáticas, respectivamente) foi semelhante ao relatado por Schop e colaboradores (2009) para CMM-MO humanas (1,6 pmol/cel.dia). Vale lembrar que $Y_{\text{amo/gln}}$ pode não ser um bom parâmetro para avaliar o metabolismo da glutamina, pois a amônia pode ser formada a partir do consumo de outros aminoácidos. Além disso, a amônia pode evaporar ao longo da cultura e ser formada pela degradação espontânea da glutamina.

Em todos os experimentos realizados, foi observada a formação de aglomerados de células e microcarregadores, conforme mostrado nas Figuras 5.7 e 5.8. Esta formação teve início no quinto dia de cultivo, aumentando de tamanho com o passar dos dias. Estes aglomerados dificultaram a recuperação das células no final do experimento. Em função disso, foi padronizado o término do experimento no sétimo dia, pois foi verificou-se que após 7 dias, apesar do crescimento ser maior, a recuperação das células diminuiu de maneira significativa a recuperação celular. Isso pode ser evidenciado nas 10 amostras apresentadas neste trabalho. Nas oito

amostras que tiveram o cultivo finalizado após 7 dias, a recuperação média foi de 78,8% com viabilidade de aproximadamente 95%. Já nos dois cultivos finalizados com 10 dias, a estimativa de recuperação foi de 24%. Este valor é uma estimativa, pois a determinação da densidade celular na amostra retirada foi prejudicada em função da não dissociação total das células que estavam aderidas aos microcarregadores.

Apesar de dificultar a recuperação das células, a formação de aglomerados pode, de acordo com Santos e colaboradores (2010), contribuir para a proliferação celular, pois pode originar nichos de hipóxia. A tensão de oxigênio é um importante regulador no nicho da medula óssea, de autorenovação e/ou diferenciação das CMM. Grayson e colaboradores (2006) mostraram que sob hipóxia (2%O₂) a síntese de proteínas de matriz extracelular como a fibronectina é aumentada.

Apesar de já terem sido realizados diversos trabalhos mostrando o crescimento de CMM-MO humana em microcarregadores, a maioria deles só está voltada para a análise do comportamento celular nesse sistema de cultivo. Um deles, que utiliza CMM-MO de coelho (BOO et al., 2011) mostra a recuperação das células pós cultivo mas não a quantificação das mesmas, apenas a estimativa diária pelo método do MTT. A recuperação celular mostrada neste trabalho é um dos aspectos que o diferencia dos demais trabalhos da literatura. A garantia da recuperação do maior número de células possíveis pós-expansão com adequada qualidade terapêutica é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de um bioprocessos para produção de células mesenquimais de grau clínico.

Por outro lado existe outra aplicação do cultivo de células em microcarregadores, em que não é interessante a dissociação celular, como exemplo tem-se o trabalho publicado por Yang e colaboradores (2007) que mostrou a eficiência da expansão de CMM-MO de ratos em Cultispher S, que defende aplicá-los diretamente no local da lesão, pois isso diminuiria a apoptose causada pelo processo enzimático e aumentaria a indução na formação do osso *in vivo*.

Em uma rápida análise, não foi encontrado nenhum trabalho que faz a expansão de células humanas em microcarregadores que mostre a recuperação de células com alta viabilidade. Os trabalhos estão voltados apenas ao crescimento e metabolismo das células em expansão (YANG et al., 2007, SERRA et al., 2008, HEWITT et al., 2011, SHI et al., 2010, SCHOP et al., 2009, EIBES et al., 2010, SART et al., 2010).

Um dos requisitos essenciais no desenvolvimento de um bioprocesso de expansão de CT de grau clínico é a manutenção das características imunofenotípicas e de multipotência. Fenotipicamente, de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CMM são caracterizadas por uma morfologia fibroblastóide, positividade para os marcadores de CMM (CD105, CD90 e CD73) e negativa para os marcadores hematopoéticos (CD45, CD34, CD14) (DOMINICI et al., 2006). Não foi observada diferença na expressão da maioria dos marcadores de superfície antes e após a expansão nos microcarregadores, com exceção do CD73, um dos marcadores de CMM que é regulado pela hipóxia ($p=0,048$) em que houve aumento na expressão, e CD146 ($p=0,018$) em que houve diminuição, porém esta é uma molécula de adesão encontrada principalmente nas células endoteliais. Timmins e colaboradores, (2012) também não encontraram diferenças significativas na expressão dos marcadores de superfície analisados pré e pós cultivo de CMM derivadas da placenta em microcarregadores.

As células expandidas em microcarregadores também mantiveram a capacidade de diferenciação em osteócitos e adipócitos assim como nos trabalhos presentes na literatura (FRAUENSCHUH et al., 2007, EIBES et al., 2010, TIMMINS et al., 2012, SUN et al., 2010). A diferenciação em osteócitos foi evidenciada pelo acúmulo de cristais de oxalato de cálcio corados com Von Kossa. Os adipócitos foram caracterizados pela formação de gotículas de gordura que foram coradas pelo SudanII-Escarlate. Não foi observada diferença qualitativa na diferenciação em adipócitos e osteócitos nas amostras de CMM-MO pré e pós cultivo em microcarregadores.

Além das características imunofenotípicas e de multipotência, as células também não sofreram anomalias cromossômicas clonais após a expansão em microcarregadores, conforme mostrado através da análise citogenética de 50 metáfases em cinco amostras analisadas.

O ensaio de inibição da proliferação de linfócitos *in vitro* é um teste funcional, visto que as CMM possuem propriedades imunomodulatórias (NAUTA & FIBBE, 2007). Em nenhum dos artigos encontrados na literatura houve a realização deste ensaio funcional nas células expandidas em microcarregadores. No presente estudo a porcentagem média de inibição da proliferação das CMN pelas CMM-MO ($n=5$) pré e pós cultivo foi, respectivamente: 81,45% e 88,27% ($p=0,06$) na concentração de 1:2; 66,38% e 78,03% ($p=0,03$) na concentração de 1:5 e 56,22% e 65,58% ($p=0,06$)

na concentração de 1:10. Na concentração 1:5 houve um aumento significativo do ponto de vista estatístico na inibição da proliferação das amostras pós cultivo. Este fato evidencia que não houve perda desta capacidade, pelo contrário, pode ter havido um aumento do potencial das CMM em inibir a proliferação de linfócitos *in vitro*.

Conforme já citado, a principal limitação do sistema de expansão de CMM em microcarregadores parece ser a dificuldade de recuperação das células ao final do cultivo devido à intensa formação de agregados de células e microcarregadores. Esta formação de agregados pode limitar o crescimento celular, pois nem todas as células principalmente as células no interior dos aglomerados, recebem nutrientes importantes ao metabolismo. Em função disto, objetivou-se nesta última etapa do trabalho a otimização de algumas condições de cultivo para diminuir a formação destes agregados e com isso aumentar o crescimento e a recuperação final das células.

Tendo em vista que uma das funções da agitação durante o cultivo é garantir a distribuição homogênea de células nas partículas de microcarregadores (GE HEALTHCARE, 2005), uma das estratégias selecionadas para diminuir a formação de aglomerados foi aumentar a agitação de maneira gradativa a partir do terceiro dia de cultivo. Esta estratégia não se mostrou favorável, pois inibiu o crescimento celular. A densidade máxima de células no sétimo dia foi de $3,6 \times 10^5$ cel/mL no experimento controle (sem alteração da velocidade) e $1,3 \times 10^5$ cel/mL no experimento sob agitação gradativa. Houve recuperação de 100% das células aderidas aos microcarregadores nos dois experimentos.

Um dos principais fatores que afetam o crescimento celular nos microcarregadores é a etapa de adesão das células. Um bom nível de crescimento celular é proveniente da adesão uniforme das células nas partículas de microcarregadores (MALDA et al., 2003; FRAUENSCHUH et al., 2007). Na tentativa de diminuir a formação de aglomerados e também minimizar a morte celular nas primeiras horas de cultivo, foram testadas diferentes condições de adesão: aumentar o volume inicial de 17 para 50 mL para melhorar a distribuição das células, alterar o regime de agitação intermitente e adição de 0,1% de Pluronic, que é um copolímero de etileno e óxido de propileno utilizado frequentemente nos cultivos agitados como um agente antiespumante e estabilizador de membrana contra a tensão de cisalhamento.

A adesão celular nos 3 primeiros cultivos foi semelhante, no entanto no *spinner* em que houve adição do Pluronic (0,1%) as células demoraram a aderir, restando 25% das células em suspensão após 6 horas de cultivo e em média 4,8% no outros 3 cultivos. O crescimento máximo atingido foi no experimento controle $3,8 \times 10^5$ cel/mL com $\mu_{\max}$ de $0,025 \text{ h}^{-1}$ com recuperação de 86,4% e 95,8% de viabilidade.

Na segunda condição de cultivo, a densidade celular máxima foi $2,8 \times 10^5$ cel/mL, recuperação celular de 100% com 94,3% de viabilidade e $\mu_{\max}$ de $0,025 \text{ h}^{-1}$. Na terceira condição a densidade celular atingiu $2,7 \times 10^5$ cel/mL, $\mu_{\max}$ de $0,028 \text{ h}^{-1}$, recuperação de 87,3% das células com 96,6% de viabilidade, foi a menor densidade celular atingida dos quatro cultivos e com a maior velocidade máxima de crescimento. A última condição, com adição do Pluronic® F-68 teve como densidade máxima $3,2 \times 10^5$ cel/mL, recuperação de 89% das células com viabilidade de 95,6% e $\mu_{\max}$ de $0,027 \text{ h}^{-1}$.

A próxima estratégia testada com o intuito de diminuir a formação de aglomerados foi a avaliar se células provenientes de um cultivo agitado, se cultivadas em maiores velocidades de agitação formariam menos aglomerados. Para isso foram realizados 2 cultivos sucessivos. Um deles teve aumento de agitação gradativo (60rpm no 3º dia, 70 rpm no 4º dia e 80 rpm no 5º dia). No quinto dia o experimento foi tripsinizado e as células inoculadas novamente sob agitação de 80rpm em um *spinner* de 250mL com volume de trabalho de 100mL. O segundo cultivo foi realizado sob agitação constante de 50 rpm, sendo que no sétimo dia as células foram tripsinizadas e inoculadas em um *spinner* de 250mL com volume de trabalho de 100mL e agitação constante de 50rpm. Novamente foi observado o efeito negativo do aumento gradativo da agitação no crescimento celular. As células que já estavam adaptadas a velocidade de agitação de 80 rpm, não apresentaram crescimento quando tripsinizadas e inoculadas na mesma velocidade. No experimento de cultivo sucessivo sob agitação constante, a densidade celular chegou a $6,6 \times 10^5$ cel/mL, valores até então nunca alcançados neste trabalho. No entanto, a recuperação final foi extremamente baixa, em torno de 23%. Foi observado neste trabalho que quanto maior o crescimento celular, após ser atingida a confluência dos microcarregadores, pior é a recuperação. Portanto, para se ter uma recuperação celular satisfatória no final do cultivo é preciso ponderar tanto o crescimento celular quanto a formação de aglomerados. Maiores tempos de cultivo promovem um maior crescimento celular. Entretanto, como a formação de

aglomerados é maior, a recuperação fica prejudicada. Talvez se esse experimento estivesse sido terminado antes do décimo quarto dia teríamos um bom crescimento e uma boa recuperação final.

7. CONCLUSÕES

- a) O microcarregador Cytodex 3 demonstrou ser capaz de sustentar o crescimento satisfatório de CMM-MO humanas sob condições agitadas. Foi possível produzir aproximadamente $4,9 \times 10^5$ cel/mL em 7 dias de cultivo, o que representa uma expansão média de 3,9 vezes. As células apresentaram uma velocidade específica de crescimento máxima de $0,027 \text{ h}^{-1}$ e um tempo de duplicação de 25,7 horas.
 - b) A análise do metabolismo celular durante o cultivo no microcarregador Cytodex 3 demonstrou que as trocas parciais de meio de cultura proporcionaram um ambiente favorável à proliferação celular, pois não houve exaustão de nutrientes importantes como glicose e glutamina e não houve formação dos subprodutos lactato e amônia em concentrações inibitórias. O mesmo aconteceu nos cultivos realizados em garrafas estáticas.
 - c) A expansão utilizando a tecnologia de microcarregadores propiciou a obtenção de maior rendimento celular. No último dia de cultivo, a densidade celular foi de $5,54 \times 10^4 \text{ cel/cm}^2$ nos microcarregadores e $3,31 \times 10^4 \text{ cel/cm}^2$. Além disso, o custo estimado para a expansão de uma mesma quantidade de células foi por volta de duas vezes superior nas garrafas estáticas quando comparado ao cultivo em microcarregadores.
 - d) A expansão nos microcarregadores não alterou as características imunofenotípicas das células, tampouco a capacidade de se diferenciar em células de origem mesodermal (adipócitos e osteócitos), de inibir a proliferação de linfócitos *in vitro* e o perfil citogenético.
-

- e) Nenhuma das alternativas para diminuir a formação de aglomerados de células e microcarregadores avaliadas foi satisfatória em termos de crescimento celular e recuperação das células pós cultivo.

De maneira geral, pode-se concluir ao longo do desenvolvimento deste trabalho que a tecnologia de microcarregadores é viável e exeqüível, pois permitiu a expansão de células com adequada qualidade terapêutica em um sistema de cultivo de custo inferior e, mais importante, escalonável.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ALHADLAQ, A.; MAO, J. J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v. 13, n. 4, p. 436-448, 2004.

ALMEIDA-PORADA, G.; EL SHABRAWY D.; PORADA, C.; ZANJANI, E. D. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Exp.Hematol.**, v. 30, n. 12, p. 1454-1462, 2002.

ALSALAMEH, S.; AMIN, R.; GEMBA, T.; LOTZ, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 5, p. 1522-1532, 2004.

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

ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de Células de Mamíferos Cultivadas *In Vitro*. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Roca, p. 81-104, 2007.

BARTHOLOMEW, A.C., STURGEON, C., SIATSKAS, M., et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. **Exp. Hematol.**, v.30, p.42-48, 2002.

Referências Bibliográficas

BEN-AMI, E., BERRIH-AKNIN, S., MILLER, A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. **Autoimmun Rev.** n. 10, p. 410-415, 2011.

BIEBACK, K.; KINZEBACH, S. *ET AL.* Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells. **Stem Cells Int**, v.2010, p.193-519, 2011.

BOO, L.; SELVARATNAM, L.; TAI, C.C.; AHMAD, T.S.; KAMARUL, T. Expansion and preservation of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture. **J Mater Sci**, v. 22, p. 1343-1356, 2011.

BÜHRRING H. J.; BATTULA V. L.; TREML S. *ET AL.* "Novel markers for the prospective isolation of human MSC". **Annals of New York Academy of Sciences**; v. 1106, p. 262-271, 2007.

CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J. Cell Physiol.**, v.213, p.341-347, 2007.

CARRARA, R.C.; ORELLANA, M.D.; *ET AL.* Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. **Braz J Med Biol Res**, 2007.

CHEN, X.; XU, H.; WAN, C.; McCAIGUE, M. *ET AL.* Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 2052-2059, 2006.

CHICO, E., RODRIGREZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para Células Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Roca, p. 216-254, 2007.

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

Referências Bibliográficas

COVAS, D.T., PANEPUCCI, R.A., FONTES, A.M., SILVA, W.A. JR., ORELLANA, M.D., FREITAS, M.C. *ET AL.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146(+) perivascular cells and fibroblasts. **Exp. Hematol.**, v. 36, n. 5, p. 642-654, 2008.

COVAS, D. T.; PICCINATO, C. E.; ORELLANA, M. D.; SIUFI, J. L.; SILVA, W. A., Jr.; PROTO-SIQUEIRA, R. *ET AL.* Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Exp.Cell Res.**, v. 309, n. 2, p. 340-344, 2005.

COVAS, D. T.; SIUFI, J. L.; SILVA, A. R.; ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

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

DALEY, G. Q.; GOODELL, M. A.; SNYDER, E. Y. Realistic prospects for stem cell therapeutics. **Hematology**, p. 398-418, 2003.

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

DE BARTOLO, L.; PISCIOPERI, A.; COTRONEO, G.; SALEMO, S.; TASSELLI, F.; CAMPANA, C. *et al.* Human lymphocyte PEEK-WC hollow fiber membrane bioreactor. **J. Biotechnol**, v. 132, p. 65-74, 2007.

DE LIMA PRATA, K.. ORELLANA, M.D. *ET AL.* Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients. **Exp Hematol**, v.38, n.4, Apr, p.292-300, 2010.

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

Referências Bibliográficas

DIGIROLAMO, C. M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY, D. G.; CLASS, R.; PROCKOP, D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **Br.J.Haematol.**, v. 107, n. 2, p. 275-281, 1999.

DJOUAD, F., PELCE, P., BONY, C., et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood.**, v. 102, p.3837-3844, 2003.

DOMINICI, M.; LE, B. K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. ET AL. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

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

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

EIBES, G.; DOS SANTOS, F.; ANDRADE, P.Z.; BOURA, J.S., et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred system. **Journal of Biotechnology**, v. 146, p.194-197, 2010.

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

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

Referências Bibliográficas

FERNANDES, A.M.; MARINHO, P.A.N., SARTORE, R.C., PAULSEN, B.S., et al. Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 512-522, 2009.

FISCHER, U.M.; HARTING, M.T.; JIMENEZ, F. J.; XUE, M.H.; SAVIRZ, S.I.; LAINE, G.A.; COX-JR, C.S.; Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 5, p. 683-691, 2009.

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

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

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

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

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

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

HEWITT, C.J., LEE, K., NIENOW, A.W., THOMAS, R.J., et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on micorcarriers. **Biotechnol Lett**, n. 33, v.11, p. 2325-2335, 2011.

Referências Bibliográficas

- HUANG, D.; BALIAN, G.; CHHABRA, B. Tendon Tissue Engineering and GeneTransfer: The Future of Surgical Treatment. **J. Hand. Sur.**, v. 31, p. 693-704, 2006.
- IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S.; TAKASHI, T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy.**, v. 6, n. 6, p. 543-553, 2004.
- JORGENSEN, C.; GORDELADZE, J.; NOEL, D. Tissue engineering autologous mesenchymal stem cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p. 406-410, 2004.
- KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.**, v. 95, n. 5, p. 209-214, 2004.
- KING, J.A.; MILLER, W.M. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.11, n.4, p.394-398, 2007.
- KIROUAC, D.C.; ZANDSTRA, P.W. The systematic production of cells for cell therapies. **Cell Stem Cell**, v. 3, p. 369-381, 2008.
- KNAZEK, R.A.; WU, Y.W.; AEBERSOLD, P.M. AND ROSENBERG, S.A. Culture of human tumor infiltrating lymphocytes in hollow fiber bioreactors. **J Immunol Methods**, v. 127, p. 29–37, 1990.
- KORTESIDIS, A.; ZANNETTINO, A.; INSENMANN, S.; SHI, S.; LAPIDOT, T. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal cells. **Blood**, v.105(10), p.3793-801, 2005.
- KRAMPERA, M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v. 39, p. 678–683, 2006.
- LE BLANC, K.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; GOTHERSTROM, C.; HASSAN, M.; UZUNEL, M. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host
-

Referências Bibliográficas

disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439-1441, 2004.

LE BLANC, K.; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy**, v. 7, n. 1, p.36-45, 2005.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biol.Blood Marrow Transplant.**, v. 11, n. 5, p. 321-334, 2005.

LE BLANC, K., RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **J Intern Med.** v. 262, n. 5, p. 509-525, 2007.

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

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

LÉO, P.; GALESI, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, A. M. Células Animais: Conceitos Básicos. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Roca, p. 15-41, 2007.

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

MALONE, C.C.; SCHILTZ, P.M.; MACKINTOSH, A.D.; BEUTEL, L.D.; HEINEMANN, F.S. AND DILLMAN, R.O. Characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes expanded in hollow-fiber bioreactors for immunotherapy of cancer. **Cancer Biother. Radiopharm**, v. 16, p. 381-390, 2001.

MANTALARIS, A., KENG, P., BOURNE, P., CHANG, A.Y., WU, J.H.Engineering a human bone marrow model: a case study on ex vivo erythropoiesis. **Biotechnol. Prog.**,v. 14, p. 126-133, 1998

Referências Bibliográficas

MARIGO, I. AND DAZZI, F. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. **Seminars in Immunopathology**. p. 1-10, 2011.

MIZUKAMI, A. Expansão *in vitro* de células-tronco mesenquimais cultivadas em biorreator de fibra oca. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

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

NG, Y.C; BERRY, J.M. and BUTLER, M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 50, n. 6, p. 627- 635, 1996.

NIE, Y.; BERGENDAHL, V.; HEI, D.J.; JONES, J.M. and PALECEK, S.P. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. **Biotechnol. Prog.**, v. 25, n. 1, p.20-31, 2009.

OHYABU, Y., KIDA, N., KOJIMA, H., TAGUCHI, T., TNAKA, J. et al. Cartilaginous tissue formation from bone marrow cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** v. 95, p. 1003-1008, 2006.

PAN, D.; STRONCEK, D.F. AND WHITLEY, C.B. Improved gene transfer and normalized enzyme levels in primitive hematopoietic progenitors from patients with mucopolysaccharidosis type I using a bioreactor. **J. Gene Med**, v. 6, p. 1293-1303, 2004.

PANEPUCCI, R.E., SIUFI, J.L. ET AL. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.22, n.7, p.1263-78. 2004.

PERCELL. Macroporous microcarriers. **Percell Biolytica**, 2011. Disponível em: <http://www.percell.se/history.htm>. Acesso em 13/02/2012.

PHARMACIA (1981), Microcarrier cell culture: Principles and methods.

Referências Bibliográficas

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

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D. ET AL. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C. M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2615-2625, 2001.

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

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

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; JODON de VILLEROCHÉ, V.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYE, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab Invest**, v. 85, n. 8, p. 962-971, 2005.

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

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

Referências Bibliográficas

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149-155, 2004.

SENSEBE, L.; BOURIN, P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. **Transplantation**, v.87, p.49-53, 2009.

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

SHI, B.; ZHANG, S.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; CHU, J.; ZHANG, S. et al. Expansion of mouse sertoli cells on microcarriers. **Cell Proliferation**, v.43, p.275-286, 2010.

SILVA, W.A., COVAS, D.T. ET AL. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.21, n.6, p.661-9. 2003.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 58-62, 1988.

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

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.

STUTE, N.; HOLTZ, K.; BUBENHEIM, M.; LANGE, C.; BLAKE, F.; ZANDER, A. R. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. **Exp.Hematol.**, v. 32, n. 12, p. 1212-1225, 2004.

SUBBANNA, P.K. Mesenchymal stem cells for treating GVHD: *In vivo* fate and optimal dose. **Med. Hypotheses**, v.69, p.469-470, 2007.

Referências Bibliográficas

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

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M. et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n. 1, p. 31-40, 2003.

TIMMINS, N.E., KIEL, M., GUNTHER, M., HEAZLEWOOD, C. et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. **Biotechnol. Bioeng.** doi: 10.1002/bit.24425., 2012.

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

ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C.M.; HUS, V.S. et al. Cultured systems for pluripotent stem cells. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, v. 100, n.1, p. 12-17, 2005.

UCCELLI, A., MORETTA, L., PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev Immunol.**, n.8, p.726-736, 2008.

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

VERFAILLIE, C. M.; PERA, M. F.; LANSDORP, P. M. Stem cells: hype and reality. **Hematology. (Am.Soc.Hematol.Educ.Program.)**, p. 369-391, 2002.

WANG, T.Y., BRENNAN, J.K., WU, J.H. Multilineal hematopoiesis in a three-dimensional murine long-term bone marrow culture. **Exp. Hematol.**, n. 23, p. 26-32, 1995.

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

Referências Bibliográficas

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

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS, K. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anat.Rec.**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C., Jr. Adult stem cells. **Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.**, v. 276, n. 1, p. 75-102, 2004.

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

WANG, D.; LIU, W.; HAN, B.; XU, R. The bioreactor: a powerful tool for large-scale cultivation of animal cells. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p;1-7, 2005.

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

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

ZEITHNEWS, a technology team application. **Zeithnews nanotechnology**, 2011. Disponível em: <http://www.zeitnews.org/nanotechnology/localized-delivery-of-an-anti-cancer-drug-by-remote-controlled-microcarriers.html>. Acesso em 13/02/2012.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido.**ANEXO 1****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A COLETA DE MEDULA ÓSSEA****Nome do projeto de pesquisa:**

“Avaliação da expansão in vitro de células mesenquimais multipotentes da veia umbilical e de células mesenquimais estromais multipotentes da medula óssea em frasco spinner com microcarregador”

Prezada paciente,

Gostaríamos de convidá-la a participar deste projeto de pesquisa que está sendo desenvolvido no Centro de Terapia Celular – Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP, com o objetivo de conhecer e estudar melhor a expansão em larga escala das células mesenquimais multipotentes e sua capacidade de formar vasos sanguíneos.

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente esse documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas e se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

A célula mesenquimal multipotente apresenta grande potencial para ser utilizada no tratamento de diversas doenças, isso porque ela é capaz de se transformar em diferentes tipos de células que compõem ossos, músculos, tendões, tecido adiposo, entre outros. No indivíduo adulto, a medula óssea é a principal fonte de células-tronco e por isso queremos estudá-la.

Pretendemos com esse trabalho isolar as células mesenquimais multipotentes da medula óssea, proporcionar seu crescimento em laboratório e avaliar suas propriedades de expansão, diferenciação, expressão gênica e formação de novos vasos in vivo. Este estudo irá proporcionar um melhor entendimento sobre as características destas células, permitindo avanços importantes nos estudos sobre as doenças ligadas principalmente aos vasos sanguíneos, como por exemplo, infarto e derrame. Estas células não serão aplicadas em seres humanos.

Apêndices

Se você concordar em participar dessa pesquisa e assinar este termo de consentimento, será coletado 5 mL de medula óssea da crista ilíaca posterior, de onde serão extraídas as células a serem utilizadas nesta pesquisa. Os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas (acúmulo de sangue debaixo da pele), sensação dolorosa no local da punção e reação alérgica à anestesia. Seu consentimento irá auxiliar-nos a compreender melhor as características da célula mesenquimal multipotente com o intuito de melhorar ou inventar novos tratamentos utilizando esta célula.

A pesquisa será concluída em 2 anos, mas será coletada amostra de medula óssea apenas uma vez e se você estiver de acordo, as células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no Banco de amostras biológicas do laboratório de terapia celular, para análises futuras, com finalidade científica. Para que isso ocorra é necessário que ouça mais algumas explicações e assine um termo de consentimento específico, autorizando a conservação deste material. Se você não estiver de acordo com a conservação do excedente das células coletadas, basta nos avisar verbalmente e não assinar o termo que permite a guarda desse material. Nestes casos, o excedente de células será descartado ao término deste estudo.

Asseguramos que todas as informações são de caráter confidencial. Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento;

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será auxiliar-nos a entender melhor sobre as células tronco no indivíduo adulto.

Para o esclarecimento de qualquer dúvida sobre esta pesquisa, favor entrar em contato com Sâmia Rigotto Caruso, telefone (16) 2101-9300 (ramal 9699).

Eu, _____

_____, RG N° _____, autorizo a coleta de 5 mL de medula óssea, para a realização de pesquisa com células mesenquimais estromais multipotentes isoladas da medula óssea. Foi informada (o) sobre o procedimento, e que o volume coletado será utilizado apenas para fins de pesquisa científica e não para tratamento de pacientes. A finalidade desta pesquisa é avaliar a capacidade de expansão das células mesenquimais estromais multipotentes da medula óssea em larga escala para futura aplicação na terapia celular. Declaro que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que livremente manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável:_____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Anexo 2: Termo de consentimento para guarda de material biológico**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Eu, Sâmia Rigotto Caruso, declaro ser responsável pelo banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CRH-HCFMRP-USP) criado com o objetivo de guardar o excedente do material biológico coletado para o projeto de pesquisa intitulado avaliação da expansão in vitro de células mesenquimais multipotentes da veia umbilical e de células mesenquimais estromais multipotentes da medula óssea em frasco spinner com microcarregador, com o qual você já concordou em participar.

Este armazenamento se faz necessário porque estas células provavelmente serão utilizadas para estudos futuros, complementares aos conhecimentos inicialmente obtidos.

O material biológico excedente deste projeto será armazenado em tanques de nitrogênio líquido próprios para este fim, localizados em sala específica, no CRH-HCFMRP-USP.

Desta forma, gostaria de convidá-lo (a) para guardar o material biológico excedente da sua doação de () cordão umbilical, () medula óssea, para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr.(a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Eu me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra doada será identificada por meio de um código contendo letras e números, relacionados com a fonte, cordão umbilical ou medula óssea, e com a ordem de entrada neste projeto.

Apêndices

Solicito ainda, que o (a) senhor (a) me passe os dados de como eu possa encontrá-lo para que eu possa fornecer informações de seu interesse sobre este projeto.

Declaro também, que toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será buscado novamente seu consentimento específico, bem como será submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Agradeço a colaboração, colocando-me à disposição para os esclarecimentos que fizerem necessários.

Atenciosamente,

Sâmia Rigotto Caruso - Pesquisadora responsável
Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP
Rua Tenente Catão Roxo 2501 – Telefone (16) 21019300 ramal: 9699

Certificado de Consentimento

Eu, _____
_____, RG _____, morador na rua
_____, nº _____, Bairro
_____, cidade _____, telefone
_____ abaixo assinado, tendo recebido as
informações acima, aceito que minha amostra de material biológico seja
armazenada no Laboratório de Terapia Celular do Centro Regional de
Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, sob a responsabilidade de Sâmia Rigotto Caruso, para fins de pesquisa
e análise científica.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do doador ou responsável

Apêndice B

Tabela B1 – Nomenclatura das amostras.

Amostras	Nomenclatura
MO42	MO1
MO63	MO2
MO05	MO3
MO07	MO4
MO10	MO5
MO56	MO6
MO57	MO7
MO51	MO8
MO50	MO10
MO64	MO11

Apêndices

Apêndice C

Tabela C1 – Crescimento celular/cm² em cultura estática (dados referentes à figura 5.9).

Tempo(dias)	MO2	MO3	MO5	MO6	MO7	MO8	MO10	Média	Desv. padrão
1	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	4,00E+03	4,00E+03	4,00E+03	6,29E+03	1,98E+03
2	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+03	0,00E+00
3	1,20E+04	1,20E+04	1,20E+04	1,20E+04	8,00E+03	8,00E+03	8,00E+02	9,26E+03	3,87E+03
4	2,40E+04	2,40E+04	2,00E+04	1,60E+04	8,00E+03	8,00E+03	4,00E+03	1,49E+04	7,62E+03
5	4,40E+04	2,80E+04	3,60E+04	2,40E+04	2,00E+04	1,60E+04	4,00E+03	2,46E+04	1,22E+04
6	5,60E+04	2,80E+04	3,60E+04	2,80E+04	2,40E+04	1,60E+04	8,00E+03	2,80E+04	1,42E+04
7	6,00E+04	3,60E+04	4,80E+04	3,20E+04	2,40E+04	2,00E+04	1,20E+04	3,31E+04	1,54E+04

Tabela C2 – Crescimento celular/cm² em frasco *spinner* (dados referentes à figura 5.9).

Tempo (dias)	MO2	MO2	MO2	MO2	MO3	MO4	MO5	MO5	MO6	MO7	Média	Desv. padrão
1	3,70E+03	1,23E+03	1,23E+03	1,85E+03	3,09E+03	1,85E+03	1,23E+03	4,32E+03	1,23E+03	3,09E+03	2,28E+03	1,11E+03
2	2,96E+03	2,47E+03	3,09E+03	2,47E+03	3,40E+03	1,85E+03	1,60E+04	1,30E+04	1,23E+03	5,56E+03	5,20E+03	4,82E+03
3	6,05E+03	9,88E+03	4,32E+03	3,70E+03	1,05E+04	3,70E+03	2,51E+04	1,60E+04	6,17E+03	1,30E+04	9,84E+03	6,43E+03
4	1,73E+04	1,54E+04	1,36E+04	7,41E+03	2,04E+04	8,02E+03	1,85E+04	2,35E+04	4,94E+03	3,33E+04	1,62E+04	8,05E+03
5	2,78E+04	3,40E+04	2,41E+04	1,05E+04	4,44E+04	2,41E+04	5,43E+04	3,15E+04	1,08E+04	5,37E+04	3,15E+04	1,48E+04
6	4,78E+04	7,78E+04	3,58E+04	2,35E+04	6,05E+04	3,33E+04	4,14E+04	3,95E+04	3,46E+04	7,04E+04	4,64E+04	1,67E+04
7	4,72E+04	8,33E+04	4,32E+04	5,12E+04	6,10E+04	5,00E+04	6,32E+04	4,44E+04	3,99E+04	7,04E+04	5,54E+04	1,31E+04

Apêndices

APÊNDICE D

Tabela D1 – Adesão das células aos microcarregadores Cytodex 3 (dados referentes à figura 5.2).

Tempo (horas)	MO1	MO3	MO4	MO5	MO5	MO6	MO2	MO7	MO2	MO2	Média	Desv. padrão
0	$4,50 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$	$3,45 \times 10^5$	$2,80 \times 10^5$	$3,00 \times 10^5$	$2,90 \times 10^5$	$2,45 \times 10^5$	$3,15 \times 10^5$	$3,30 \times 10^5$	$5,85 \times 10^4$
1	$3,50 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$	$5,50 \times 10^4$	---	---	---	---	---	$1,50 \times 10^4$	$6,00 \times 10^4$	$1,36 \times 10^5$	$1,24 \times 10^5$
2	$2,25 \times 10^4$	$1,45 \times 10^5$	$3,50 \times 10^4$	---	---	---	---	$6,50 \times 10^4$	0,00	$3,50 \times 10^4$	$5,04 \times 10^4$	$4,65 \times 10^4$
3	$3,75 \times 10^4$	$1,15 \times 10^5$	$4,00 \times 10^4$	---	$6,50 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$3,50 \times 10^4$	---	$1,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$4,16 \times 10^4$	$3,24 \times 10^4$
4	$6,50 \times 10^4$	$8,50 \times 10^4$	$4,00 \times 10^4$	---	---	---	---	$4,50 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$	$2,53 \times 10^4$
5	$1,75 \times 10^4$	---	$3,50 \times 10^4$	---	---	---	---	---	0,00	$2,50 \times 10^4$	$1,94 \times 10^4$	$1,28 \times 10^4$
6	$7,50 \times 10^3$	$8,00 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$	0,00	$3,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$3,50 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$1,50 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	$2,23 \times 10^4$

Apêndices

Tabela D2 – Crescimento celular (dados referentes à figura 5.4).

Tempo (horas)	MO1	MO3	MO4	MO5	MO5	MO6	MO2	MO7	MO2	MO2	Média	Desv. padrão
1	$3,00 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$3,50 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,85 \times 10^4$	$8,96 \times 10^3$
2	$2,40 \times 10^4$	$2,75 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,30 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$1,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$4,22 \times 10^4$	$3,91 \times 10^4$
3	$4,90 \times 10^4$	$8,50 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$2,03 \times 10^5$	$1,30 \times 10^5$	$5,00 \times 10^4$	$8,00 \times 10^4$	$1,05 \times 10^5$	$3,50 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$7,97 \times 10^4$	$5,21 \times 10^4$
4	$1,40 \times 10^5$	$1,65 \times 10^5$	$6,50 \times 10^4$	$1,50 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$	$4,00 \times 10^4$	$1,25 \times 10^5$	$2,70 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$6,00 \times 10^4$	$1,32 \times 10^5$	$6,52 \times 10^4$
5	$2,25 \times 10^5$	$3,60 \times 10^5$	$1,95 \times 10^5$	$4,40 \times 10^5$	$2,55 \times 10^5$	$8,75 \times 10^4$	$2,75 \times 10^5$	$4,35 \times 10^5$	$1,95 \times 10^5$	$8,50 \times 10^4$	$2,55 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$
6	$3,87 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$2,70 \times 10^5$	$3,35 \times 10^5$	$3,20 \times 10^5$	$2,80 \times 10^5$	$6,30 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5$	$2,90 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$	$3,76 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$
7	$7,59 \times 10^5$	$4,94 \times 10^5$	$4,05 \times 10^5$	$5,12 \times 10^5$	$3,60 \times 10^5$	$3,23 \times 10^5$	$6,75 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$	$4,15 \times 10^5$	$4,86 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$

Apêndices

Tabela D3 – Suspensão celular (dados referentes à figura 5.4).

Tempo (horas)	MO1	MO3	MO4	MO5	MO5	MO6	MO2	MO7	MO2	MO2	Média	Desv. padrão
1	$2,50 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	0,00	$3,50 \times 10^4$	0,00	0,00	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$1,27 \times 10^4$
2	$2,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	0,00	$1,00 \times 10^4$	0,00	0,00	0,00	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$7,48 \times 10^3$
3	$1,50 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	0,00	0,00	$5,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$8,43 \times 10^3$
4	$4,75 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	0,00	$5,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	0,00	$1,00 \times 10^4$	$1,32 \times 10^4$
5	$2,50 \times 10^3$	$1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	0,00	$1,25 \times 10^4$	0,00	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$4,90 \times 10^3$
6	$1,50 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$1,50 \times 10^4$	0,00	0,00	0,00	$5,00 \times 10^3$	$6,80 \times 10^3$
7	$3,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	0,00	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	0,00	$5,00 \times 10^3$	$9,75 \times 10^3$

Apêndice E

Tabela E1– Concentração de glicose cultura estática (mM) (dados referentes à figura 5.10A).

Dias	MO2	MO6	MO7	Média	Desv.padrão
1	6,00	6,00	6,33	6,11	0,16
2	6,67	6,11	5,78	6,19	0,37
3	6,11	5,56	5,67	5,78	0,24
3,1	6,95	6,67	6,73	6,78	0,12
4	5,89	5,44	5,78	5,70	0,19
5	4,00	4,44	5,33	4,59	0,55
6	2,89	3,67	4,67	3,74	0,73
7	2,44	3,22	5,89	3,85	1,47

Tabela E2– Concentração de glicose frasco *spinner* (mM) (dados referentes à figura 5.10A).

Dias	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	Média	Desv.padrão
1	5,11	3,51	3,56	5,33	4,89	4,48	0,79
2	4,44	2,67	3,56	5,11	4,33	4,02	0,84
2,1	6,11	---	---	6,45	6,06	6,21	0,17
3	4,44	2,47	3,24	4,67	4,33	3,83	0,84
3,1	6,11	5,13	---	6,21	6,06	5,88	0,43
4	2,56	2,47	2,44	4,00	3,11	2,92	0,59
4,1	5,17	5,13	5,11	5,89	5,45	5,35	0,30
5	1,78	1,13	---	4,11	2,56	2,39	1,11
5,1	4,78	---	---	5,95	5,17	5,30	0,49
6	1,56	1,56	1,80	3,67	2,44	2,21	0,80
6,1	4,67	4,67	4,79	5,73	5,11	4,99	0,40
7	0,89	1,71	2,44	3,44	2,00	2,10	0,84

Apêndice F

Tabela F1– Concentração de ácido láctico cultura estática (mM) (dados referentes à figura 5.12A).

Dias	MO2	MO6	MO7	Média	Desv.padrão
1	5,33	5,11	5,78	5,41	0,28
2	6,22	5,78	5,11	5,70	0,46
3	6,89	5,56	5,11	5,85	0,76
3,1	5,65	4,98	4,76	5,13	0,38
4	7,78	7,11	5,78	6,89	0,83
5	10,44	9,11	8,00	9,19	1,00
6	13,78	12,00	9,11	11,63	1,92
7	16,67	13,56	14,22	14,81	1,34

Tabela F2– Concentração de ácido láctico frasco *spinner* (mM) (dados referentes à figura 5.12A).

Dias	MO2	MO3	MO 4	MO5	MO6	Média	Desv.padrão
1	8,00	4,93	5,24	6,89	8,00	6,61	1,31
2	10,89	7,69	7,11	9,78	10,22	9,14	1,47
2,1	7,65	---	---	7,09	7,31	7,35	0,23
3	12,22	9,51	7,78	9,78	11,11	10,08	1,51
3,1	8,31	6,96	---	7,09	7,76	7,53	0,54
4	15,78	9,64	9,42	11,78	13,11	11,95	2,36
4,1	10,09	7,02	6,91	8,09	8,76	8,17	1,18
5	20,22	13,78	---	12,22	14,67	15,22	3,02
5,1	12,31	---	---	8,31	9,54	10,05	1,67
6	17,78	11,07	10,58	10,00	17,33	13,35	3,45
6,1	11,09	7,74	7,49	7,20	10,87	8,88	1,73
7	19,33	9,42	9,11	7,78	16,67	12,46	4,63

Apêndices

Apêndice G

Tabela G1 – Concentração de aminoácidos cultura estática (Mm) (dados referentes à figura 5.14A).

	ác. Ascórbico	ác. Glutâmico	asparagina	serina	glutamina	glicina	histidina	arginina	treonina	alanina	prolina	tirosina	valina	metionina	cisteína	isoleucina	leucina	fenilalanina	lisina
Amostra	asp	glu	asn	ser	gln	gly	his	arg	thr	ala	pro	tyr	val	met	cys	ile	leu	phe	lys
MO2.1	0,48	1,47	0,65	0,50	3,70	2,37	0,46	1,93	0,98	1,41	1,14	0,60	1,31	0,36	0,42	1,27	1,37	0,66	1,17
MO2.2	0,36	1,27	0,54	0,36	3,04	1,95	0,43	1,67	0,70	1,28	0,99	0,52	1,13	0,32	0,36	1,10	1,19	0,59	1,02
MO2.3	0,39	1,60	0,59	0,43	3,20	2,30	0,50	1,90	0,91	1,76	1,16	0,61	1,34	0,36	0,44	1,27	1,38	0,67	1,22
MO2.4	0,65	2,15	0,75	0,59	3,94	2,67	0,58	2,14	0,97	1,90	1,31	0,70	1,51	0,42	0,53	1,43	1,55	0,75	1,38
MO2.5	0,29	1,42	0,46	0,22	2,46	1,73	0,42	1,59	0,74	1,39	1,08	0,53	1,07	0,30	0,38	1,05	1,12	0,60	0,96
MO2.6	0,29	1,69	0,47	0,29	2,23	1,67	0,39	1,58	0,76	1,66	0,95	0,49	1,03	0,28	0,38	1,02	1,08	0,55	0,99
MO2.7	0,23	1,76	0,46	0,11	2,03	1,70	0,40	1,60	0,88	1,87	0,99	0,49	1,06	0,29	0,40	1,05	1,12	0,56	1,02
MO6.1	0,38	1,24	0,54	0,39	3,20	2,05	0,41	1,72	0,82	1,09	0,98	0,52	1,12	0,34	0,36	1,11	1,22	0,59	1,03
MO6.2	0,47	1,63	0,63	0,51	3,50	2,44	0,50	1,93	0,90	1,48	1,16	0,62	1,32	0,38	0,45	1,30	1,42	0,68	1,20
MO6.3	0,45	1,70	0,59	0,49	3,25	2,37	0,55	2,02	0,94	1,71	1,38	0,73	1,45	0,42	0,52	1,45	1,56	0,79	1,30
MO6.4	0,31	1,33	0,49	0,33	2,78	1,89	0,42	1,60	0,79	1,25	1,06	0,54	1,09	0,32	0,37	1,09	1,19	0,61	0,98
MO6.5	0,41	1,96	0,60	0,43	3,07	2,27	0,50	1,88	1,02	1,69	1,19	0,62	1,28	0,36	0,47	1,24	1,35	0,68	1,20
MO6.6	0,29	1,79	0,51	0,28	2,49	1,88	0,42	1,66	0,88	1,59	1,02	0,53	1,09	0,31	0,40	1,05	1,16	0,58	1,05
MO6.7	0,29	2,05	0,54	0,28	2,48	2,07	0,46	1,78	1,06	1,88	1,12	0,57	1,20	0,33	0,45	1,17	1,28	0,64	1,18
MO7.1	5,09	9,91	0,84	2,38	4,13	5,19	1,16	5,78	4,76	9,91	3,09	1,85	6,90	2,37	0,72	5,68	13,30	5,76	8,37
MO7.2	0,38	1,21	0,47	0,34	2,89	1,95	0,43	1,62	0,81	1,14	1,06	0,55	1,11	0,33	0,37	1,12	1,22	0,61	1,01
MO7.3	0,38	1,42	0,47	0,32	2,76	1,98	0,45	1,69	0,84	1,36	1,08	0,55	1,12	0,32	0,39	1,12	1,23	0,61	1,04
MO7.4	0,38	1,43	0,54	0,41	3,06	2,04	0,42	1,71	0,84	1,33	1,05	0,56	1,16	0,33	0,39	1,13	1,25	0,61	1,08
MO7.5	0,36	1,62	0,52	0,37	2,84	2,07	0,46	1,73	0,92	1,50	1,20	0,61	1,19	0,34	0,42	1,19	1,30	0,67	1,08
MO7.6	0,42	1,96	0,56	0,40	2,89	2,23	0,51	1,83	1,02	1,76	1,22	0,64	1,28	0,37	0,48	1,27	1,40	0,70	1,22
MO7.7	0,23	1,60	0,49	0,26	2,42	1,88	0,49	1,86	1,18	1,67	1,36	0,59	1,13	0,35	0,42	1,15	1,42	0,68	3,65

Apêndices

Tabela G2 – Concentração de aminoácidos frasco *spinner* (mM) (dados referentes à figura 5.14B).

Amostra	ác. Ascórbico asp	ác. Glutâmico glu	asparagina asn	serina ser	glutamina gln	glicina gly	histidina his	arginina arg	treonina thr	alanina ala	prolina pro	tirosina tyr	valina val	metionina met	cisteína cys	isoleucina ile	leucina leu	fenilalanina phe	lisina lys
MO2.1	0,23	1,13	0,45	0,23	2,56	1,83	0,40	1,74	0,84	1,37	1,20	0,57	1,17	0,34	0,35	1,12	1,15	0,63	1,00
MO2.2	0,18	1,26	0,43	0,22	2,25	1,64	0,36	1,60	0,87	1,43	1,03	0,52	1,06	0,32	0,31	0,97	1,00	0,57	0,99
MO2.3	0,27	1,51	0,53	0,31	2,71	2,09	0,46	1,88	0,87	1,72	1,26	0,63	1,30	0,36	0,39	1,19	1,22	0,68	1,18
MO2.4	0,25	1,69	0,50	0,20	2,50	1,97	0,41	1,80	0,83	1,65	1,03	0,54	1,14	0,32	0,38	1,05	1,06	0,59	1,09
MO2.5	0,13	1,33	0,43	0,11	2,16	1,72	0,35	1,64	0,83	1,66	1,00	0,52	1,09	0,31	0,35	1,07	1,05	0,57	1,05
MO2.6	0,23	1,53	0,45	0,06	2,38	2,02	0,44	1,82	0,89	1,89	1,08	0,55	1,15	0,31	0,41	1,08	1,08	0,60	1,12
MO2.7	0,28	1,68	0,53	0,06	2,55	2,01	0,44	1,78	0,88	2,00	1,04	0,51	1,09	0,30	0,39	1,04	1,08	0,56	1,09
MO3.1	0,23	0,74	0,45	0,51	2,27	1,08	0,23	0,91	0,45	0,80	0,64	0,34	0,70	0,17	0,18	0,66	0,69	0,35	0,62
MO3.2	0,21	0,85	0,45	0,57	2,13	1,18	0,25	0,96	0,52	1,11	0,66	0,36	0,75	0,18	0,18	0,67	0,70	0,37	0,69
MO3.3	0,21	1,12	0,52	0,49	2,00	1,30	0,25	0,92	0,53	1,24	0,66	0,35	0,72	0,17	0,21	0,63	0,66	0,36	0,71
MO3.4	0,10	0,45	0,19	0,20	0,74	0,49	0,10	0,33	0,18	0,42	0,33	0,15	0,26	0,06	0,09	0,26	0,27	0,16	0,24
MO3.5	0,16	0,61	0,38	0,35	1,74	0,91	0,19	0,66	0,38	0,79	0,48	0,25	0,53	0,12	0,19	0,48	0,50	0,26	0,50
MO3.6	0,14	0,70	0,40	0,36	1,74	1,19	0,26	0,86	0,54	1,34	0,66	0,34	0,70	0,16	0,22	0,64	0,65	0,36	0,64
MO3.7	0,22	0,66	0,48	0,54	2,42	1,18	0,28	0,56	0,60	0,75	0,69	0,35	0,76	0,19	0,08	0,71	0,41	0,41	0,76
MO4.1	0,28	0,82	0,55	0,67	2,94	1,27	0,27	1,00	0,50	0,95	0,68	0,37	0,79	0,18	0,21	0,73	0,76	0,38	0,74
MO4.2	0,21	0,79	0,51	0,60	2,46	1,23	0,25	0,94	0,53	1,08	0,65	0,36	0,74	0,17	0,19	0,65	0,68	0,37	0,68
MO4.3	0,17	0,88	0,52	0,41	2,17	1,30	0,27	0,83	0,54	1,10	0,63	0,29	0,60	0,15	0,19	0,52	0,58	0,33	0,63
MO4.4	0,15	0,89	0,47	0,55	1,85	1,25	0,24	0,80	0,51	1,18	0,62	0,32	0,65	0,16	0,19	0,55	0,58	0,34	0,67
MO4.5	0,15	0,90	0,48	0,50	1,93	1,35	0,26	0,83	0,54	1,24	0,69	0,35	0,72	0,17	0,22	0,63	0,65	0,38	0,70
MO4.6	0,17	0,71	0,48	0,58	2,42	1,28	0,25	0,86	0,53	1,07	0,65	0,35	0,73	0,17	0,20	0,66	0,67	0,37	0,70
MO4.7	0,21	0,75	0,49	0,57	2,45	1,28	0,26	0,87	0,51	1,02	0,70	0,36	0,74	0,17	0,13	0,67	0,69	0,37	0,70
MO5.1	0,59	1,19	0,67	0,50	3,57	2,47	0,51	2,02	1,01	1,67	1,31	0,66	1,38	0,38	0,42	1,31	1,41	0,72	1,25
MO5.2	0,45	2,00	0,58	0,37	2,82	1,95	0,44	1,78	0,87	1,61	1,06	0,57	1,19	0,34	0,37	1,09	1,19	0,63	1,13
MO5.3	0,49	1,91	0,58	0,34	2,95	2,14	0,47	1,81	0,94	1,57	1,18	0,61	1,22	0,34	0,39	1,14	1,23	0,67	1,13
MO5.4	0,36	1,60	0,49	0,16	2,50	1,80	0,39	1,62	0,82	1,45	0,95	0,51	1,05	0,29	0,35	0,99	1,06	0,57	1,00
MO5.5	0,26	1,37	0,51	0,13	2,67	1,94	0,40	1,67	0,84	1,57	0,97	0,53	1,09	0,40	0,37	1,01	1,07	0,57	1,03
MO5.6	0,14	0,98	0,46	0,04	2,62	1,89	0,43	1,63	0,85	1,57	1,05	0,54	1,08	0,30	0,37	1,06	1,12	0,59	1,00
MO5.7	0,08	0,79	0,54	0,15	3,13	2,04	0,45	1,73	0,91	1,73	1,06	0,55	1,16	0,32	0,41	1,11	1,20	0,60	1,09
MO6.1	0,33	1,69	0,57	0,38	2,93	2,17	0,39	1,84	0,81	1,42	1,04	0,57	1,23	0,36	0,37	1,48	1,19	0,63	1,12
MO6.2	0,19	1,51	0,42	0,18	2,14	1,60	0,38	1,64	0,78	1,38	1,14	0,53	1,06	0,32	0,31	0,98	1,03	0,59	0,94
MO6.3	0,33	1,89	0,60	0,41	3,10	2,28	0,48	1,99	0,92	1,77	1,23	0,65	1,38	0,39	0,41	1,27	1,31	0,71	1,27
MO6.4	0,15	1,28	0,42	0,16	2,29	1,59	0,35	1,53	0,67	1,17	1,77	0,51	0,99	0,30	0,28	0,94	0,96	0,56	0,86
MO6.5	0,27	1,90	0,51	0,20	2,75	2,22	0,48	2,03	1,03	1,85	1,24	0,63	1,33	0,36	0,39	1,23	1,25	0,68	1,26
MO6.6	0,21	1,67	0,52	0,29	2,78	1,98	0,42	1,78	0,79	1,55	1,06	0,55	1,16	0,32	0,35	1,07	1,11	0,60	1,12
MO6.7	0,24	1,84	0,56	0,26	2,94	2,27	0,49	1,95	0,90	1,85	1,21	0,63	1,32	0,37	0,39	1,20	1,25	0,69	1,28

Apêndices

Apêndice H

Tabela H1 – Adesão das CMM-MO2 em 4 diferentes condições de cultivo (n=2) (dados referentes à figura 5.22A).

Tempo (horas)	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2
0	3,15E+05	2,45E+05	1,00E+05	9,00E+04	9,50E+04	9,00E+04	1,10E+05	5,00E+04
1	6,00E+04	1,50E+04	1,00E+04	2,50E+04	1,00E+04	3,00E+04	1,50E+04	2,50E+04
2	3,50E+04	0,00E+00	5,00E+03	1,00E+04	5,00E+03	2,50E+04	2,50E+04	2,00E+04
3	1,50E+04	1,00E+04	0,00E+00	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	3,00E+04	2,00E+04
4	3,00E+04	5,00E+03	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	2,50E+04	2,50E+04
5	2,50E+04	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+04	5,00E+03	5,00E+03	2,50E+04	1,50E+04
6	1,50E+04	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	2,50E+04	1,50E+04

Apêndices

Tabela H2 – Crescimento das CMM-MO2 em 4 diferentes condições de cultivo (n=2) (dados referentes à figura 5.22B).

Tempo (dias)	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2
1	1,00E+04	1,50E+04	1,50E+04	1,00E+04	5,00E+03	5,00E+03	0,00E+00	5,00E+03
2	2,50E+04	2,00E+04	1,50E+04	5,00E+03	1,00E+04	1,00E+04	1,50E+04	5,00E+03
3	3,50E+04	3,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,50E+04	1,00E+04	1,50E+04
4	1,10E+05	6,00E+04	4,50E+04	4,00E+04	3,50E+04	4,00E+04	5,50E+04	3,50E+04
5	1,95E+05	8,50E+04	1,15E+05	9,50E+04	5,50E+04	9,50E+04	1,20E+05	1,05E+05
6	2,90E+05	1,90E+05	1,85E+05	1,30E+05	1,25E+05	2,40E+05	1,90E+05	2,20E+05
7	3,50E+05	4,15E+05	2,55E+05	3,05E+05	2,05E+05	3,30E+05	2,85E+05	3,60E+05

Tabela H3 – Suspensão das CMM-MO2 em 4 diferentes condições de cultivo (n=2) (dados referentes à figura 5.22B).

Tempo (dias)	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2
1	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	1,00E+04	1,00E+04	2,00E+04	5,00E+03
2	5,00E+03	5,00E+03	1,50E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,50E+04	5,00E+03
3	5,00E+03	5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03
4	5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+03	5,00E+03	1,00E+04	0,00E+00
5	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	5,00E+03	1,00E+04	1,00E+04	1,50E+04
6	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+03	5,00E+03	1,00E+04
7	5,00E+03	0,00E+00	5,00E+03	0,00E+00	5,00E+03	5,00E+03	1,00E+04	1,50E+04