UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

VANESSA TIEKO MARQUES DOS SANTOS

Desenvolvimento de metodologia para produção de soro AB humano para suplementação de meio de cultura destinado ao cultivo de células mesenquimais

Ribeirão Preto

2016

VANESSA TIEKO MARQUES DOS SANTOS

Desenvolvimento de metodologia para produção de soro AB humano para suplementação de meio de cultura destinado ao cultivo de células mesenquimais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Biotecnologia
Orientadora: Profª. Drª Kamilla Swiech Antonietto

"Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)".

Ribeirão Preto

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, V.T.M.
Desenvolvimento de metodologia para produção de soro AB humano para suplementação de meio de cultura destinado ao cultivo de células mesenquimais / Vanessa Tieko Marques dos Santos; Orientadora Kamilla Swiech Antonietto – Ribeirão Preto, 2016.
95 p.:Il.; 30cm
Dissertação de mestrado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

1.Soro AB humano. 2. Células mesenquimais 3. Terapia celular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Tieko Marques dos Santos

Desenvolvimento de metodologia para produção de soro AB humano para suplementação de meio de cultura destinado ao cultivo de células mesenquimais.

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

Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,

mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus,

sou melhor do que eu era antes.”

Marthin Luther King

Dedico esse trabalho aos meus pais Laércio (*in memorian*) e Lucila, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida. Desejo poder ter sido merecedor do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão desta pesquisa.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional, me apoiando em todos os momentos da minha vida.

Ao Gabriel, meu companheiro, pelo amor, dedicação e apoio em todos momentos que precisei.

Aos meus familiares e amigos pela força e torcida positiva.

A minha orientadora, Kamilla Swiech Antonietto, pelo empenho, paciência e credibilidade, obrigada por tudo.

A minha chefe, Maria Ângela Ottoboni, pela amizade e incentivo, sempre disposta a ajudar.

A Maristela Orellana, Patrícia Tozetti, Sâmia Rigotto Caruso, Taísa Risque Fernandes e Aline Luiza Costa de Godoy do Laboratório de Terapia Celular, pelas valiosas contribuições, agradeço de coração.

A Amanda Mizukami pelo apoio, auxílio e conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e Fracionamento pelos momentos de descontração e apoio.

Aos colaboradores da equipe de Enfermagem pela ajuda nas coletas.

Agradeço a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente da elaboração deste trabalho.

Aline Luiza Costa de Godoy

Amanda Mizukami

Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo

Carmem Cecilia Oliva Simão

Edson Lara Moretto

Fabíola Traina

Fernanda Borges Silva

Maria Ângela Pignata Ottoboni

Marinês Dilma Barrico Ferrassino

Mário Soares Neto

Maristela Delgado Orellana

Mayra Dorigan de Macedo

Patrícia Aparecida Tozetti

Patrícia Vianna Bonini Palma

Sâmia Rigotto Caruso

Taísa Risque Fernandes

Centro de Terapia Celular e Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

RESUMO

SANTOS, V.T.M. Desenvolvimento de metodologia para produção de soro AB humano para suplementação de meio de cultura destinado ao cultivo de células mesenquimais [dissertação] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 2016, 95f.

O crescente número de aplicações clínicas envolvendo células mesenquimais estromais multipotentes (CMMs) gera a necessidade da produção em larga escala destas células com adequada qualidade terapêutica. As CMMs são geradas atualmente através de culturas aderentes na presença de soro fetal bovino (SFB). Entretanto, apesar da eficiência na promoção do crescimento celular, o uso de SFB não é isento de desvantagens e riscos. Além do alto custo, sua utilização pode gerar risco de contaminação do produto final com agentes adventícios como vírus e príons. Por outro lado, a sua variabilidade em diferentes lotes e fornecedores dificulta a padronização do meio e reprodutibilidade do cultivo. Uma alternativa promissora para a cultura de células destinadas a terapia celular é a substituição de SFB por soro AB humano obtido a partir de plasma humano. Neste cenário, o objetivo deste trabalho foi produzir soro AB humano e avaliar a sua qualidade e eficácia como substituto do SFB na produção de células mesenquimais destinadas à terapia celular. Para a produção do soro AB humano foram avaliados tanto Plasma comum (PC>24h) (n=3) quanto Plasma isento de crioprecipitado (PCIC) (n=3). Após a produção, foi realizado o controle de qualidade dos lotes produzidos, sendo verificado que os mesmos atenderam às exigências necessárias para a utilização na terapia celular. As duas fontes de plasma utilizadas para a produção do soro AB humano apresentaram características semelhantes quanto aos constituintes bioquímicos e demais parâmetros analíticos e foram eficazes na suplementação do cultivo e expansão das CMMs. A suplementação do meio com 10% de soro AB humano foi eficaz tanto no cultivo em culturas estáticas quanto em microcarregadores. Esta característica alinha-se com a possibilidade de produção em larga escala, uma vez que, permitiu a expansão das CMMs de maneira similar à condição controle (suplementada com 10% de SFB) e preservou as características imunofenotípicas, funcionais e perfil citogenético pós cultivo. Além disso, o soro AB humano produzido pode ser utilizado

por no mínimo doze meses após produção, quando armazenado em temperatura inferior a 20ºC negativos.

Palavras chave: Soro AB humano, xenoantígenos, células mesenquimais estromais multipotentes, garrafas estáticas, microcarregadores.

ABSTRACT

SANTOS, V.T.M. Development of methodology for human AB serum production for culture medium supplementation for the cultivation of mesenchymal cells [Dissertation] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 2016, 95f.

The growing number of clinical applications involving multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) generates the need for large-scale production of these cells with appropriate therapeutical quality. The MSCs are now generated through adherent cultures in the presence of fetal bovine serum (FBS). However, despite the efficiency of this method, the use of FBS is not exempt of drawbacks and hazards. Besides the high cost, their use can lead to the risk of final product contamination with adventitious agents such as viruses and prions. In addition, due to its high variability of reproducibility, this methodology requires high level of standardization. A promising alternative would be to replace FBS by human AB serum from human plasma. In this scenario, our objective was to produce human AB serum and evaluate their quality and effectiveness as a FBS substitute on the production of mesenchymal cells for therapy. For the production of human AB serum were evaluated both common plasma (CP> 24h; n=3) and plasma cryoprecipitate depleted (PCD; n=3). Quality controls were carried out to stablish minimal requirements of quality to be used in a cell therapy scenario. Both plasma sources of human AB serum presented similar biochemical characteristics and other analytical parameters, being effective in the supplementation of the culture and expansion of MSCs. Supplementing the culture medium with 10% human AB serum was effective both in cultivation of static cultures and of cells on microcarriers. This condition might indicate that this method would be useful for large scale production, allowing the expansion of MSCs similarly to the control condition and maintaining immunophenotypic, functional and cytogenetic characteristics. Furthermore, the human AB serum produced can be used for at least twelve months after production when stored at temperature below 20ºC negative.

Keywords: human AB serum, xenoantigens, multipotent mesenchymal stromal cells, static bottles, microcarriers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
Figura 1:	Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.....	**22**
Figura 2:	Ontogenia das células tronco.....	**24**
Figura 3:	Representação simplificada do processo de fracionamento do sangue total para obtenção dos hemocomponentes	**31**
Figura 4:	Representação esquemática do procedimento experimental adotado para cultivo de CMMs em garrafa estática durante a realização do trabalho.....	**35**
Figura 5:	Representação esquemática do procedimento experimental adotado para cultivo de CMMs em microcarregador e frasco *spinner*.....	**37**
Figura 6:	Morfologia das células mesenquimais cultivadas nos diferentes suplementos na sexta passagem.....	**56**
Figura 7:	Cinética de expansão das células mesenquimais cultivadas nos meios suplementados com os lotes de soro AB humano produzidos do primeiro ao décimo segundo mês após produção e com SFB.....	**58**
Figura 8:	Tempo de duplicação das células mesenquimais cultivadas nos meios suplementados com os lotes de soro AB humano produzidos do primeiro ao décimo segundo mês após produção e com SFB como cultivo controle.....	**59**
Figura 9:	Avaliação da influência do tempo de estocagem do soro AB humano no crescimento das células mesenquimais..	**60**
Figura 10:	Crescimento das CMM cultivadas em microcarregador e frasco *spinner*.....	**63**

Figura 11: Concentração de glicose e lactato durante o cultivo realizado em microcarregador em frasco *spinner* com meio suplementado 10% Soro AB humano convertido e 10% SFB..... **65**

Figura 12: CMM ao longo do cultivo em microcarregador, suplementada com Soro AB humano e SFB..... **66**

Figura 13: Principais marcadores imunofenotípicos das CMMs cultivadas em garrafas estáticas nos meios suplementados com os lotes de soro AB humano produzidos e com SFB como cultivo controle..... **68**

Figura 14: Principais marcadores imunofenotípicos das CMMs pré e pós cultivo em microcarregadores nos meios suplementados com os lotes de soro AB humano produzidos e com SFB..... **68**

Figura 15: Diferenciação de células provenientes das culturas estáticas em adipócitos..... **70**

Figura 16: Diferenciação de células provenientes das culturas estáticas em osteócitos..... **70**

Figura 17: Diferenciação de células provenientes das culturas em microcarregador e frasco *spinner* em adipócitos..... **71**

Figura 18: Diferenciação de células provenientes das culturas em microcarregador e frasco *spinner* em osteócitos..... **71**

Figura 19: Inibição da proliferação dos linfócitos T pelas CMMs cultivadas nos meios suplementadas com soro AB humano e SFB..... **73**

Figura 20: Inibição da proliferação dos linfócitos T (porcentagem) pelas CMMs pós cultivo em frasco *spinner* nos meios suplementadas com soro AB humano e SFB..... **73**

Figura 21: Cariótipo da CMM pós cultivo em meio suplementado com soro AB humano convertido em garrafa estática e frasco *spinner*..... **74**

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Quantidade e rendimento dos lotes de soro AB humano produzidos..... **46**

Tabela 2 - Controle de qualidade dos lotes de soros AB humanos produzidos..... **47**

Tabela 3 - Perfil bioquímico dos lotes de soro após produção..... **51**

Tabela 4 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 3 meses de estocagem..... **52**

Tabela 5 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 6 meses de estocagem..... **53**

Tabela 6 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 9 meses de estocagem..... **54**

Tabela 7 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 12 meses de estocagem..... **55**

Tabela A1 - Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no primeiro mês após produção e com SFB como cultivo controle..... **86**

Tabela A2 - Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no terceiro mês após produção e com SFB como cultivo controle..... **86**

Tabela A3 - Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no sexto mês após produção e com SFB como cultivo controle..... **87**

Tabela A4 - Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no nono mês após produção e com SFB como cultivo controle..... **87**

Tabela A5 - Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no décimo segundo mês após produção e com SFB como cultivo controle..... **88**

Tabela A6 - Tempo de duplicação celular obtido nos diferentes suplementos e tempos de estocagem na quinta passagem..... **89**

Tabela A7 - Tempo de duplicação celular obtido nos diferentes suplementos e tempos de estocagem na sexta passagem..... **90**

Tabela A8 - Tempo de duplicação celular obtido nos diferentes suplementos e tempos de estocagem na sétima passagem..... **91**

Tabela B1 - Crescimento celular em frasco *spinner* de acordo com o meio utilizado..... **92**

Tabela B2 - Concentração de glicose no frasco *spinner* (mM) de acordo com o meio utilizado..... **93**

Tabela B3 - Concentração de lactato frasco *spinner* (mM) de acordo com o meio utilizado..... **93**

Tabela C1 - Caracterização imunofenotípica das células cultivadas em garrafas estáticas de acordo com o meio utilizado. **94**

Tabela C2 - Caracterização imunofenotípica das células cultivadas em microcarregador de acordo com o meio utilizado.... **94**

Tabela D1 - Inibição da proliferação dos linfócitos T (porcentagem pelas CMMs cutivadas em garrafas estáticas de acordo com o meio suplementado..... **95**

Tabela D2 - Inibição da proliferação dos linfócitos T (porcentagem pelas CMMs cutivadas em microcarregador de acordo com o meio suplementado..... **95**

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALT	Alanina transaminase
α - MEM	do inglês, "*minimal essential medium-alpha*"
APC	do inglês, "*allophycocyanin*"
AST	Aspartato transaminase
CD	do inglês, "*cluster of differentiation*"
CFSE	do inglês, "*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*"
CFU-F	do inglês, "*colony forming unit-fibroblast*"
CMM	Células mesenquimais estromais multipotentes
CMN	Células mononucleares
CO_2	Dióxido de carbono
CPDA-1	Anticoagulante citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina
CRIO	Crioprecipitado
DAPI	Corante 4,6-diamino-2-phenylindole
FITC	do inglês, "*fluorescein isothiocyanate*"
GMP	do inglês, "*good manufacturing practice*"
GVHD	Doença do enxerto-versus-hospedeiro
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	do inglês, "*Human leucocyte antigen*"
HNA	do inglês, "*Human neutrophil antigen*"
HTLV	Vírus linfotrópico da célula humana
hUSC	Soro humano de sangue do cordão umbilical

ISCN	do inglês, "*International Sistem for Human Citogenetic Nomenclature*"
ISCT	do inglês, "*International Society for Cellular Therapy"*
KCl	Cloreto de potássio
LP	Lisado plaquetário
MO	Medula óssea
NAT	Teste de ácidos nucleicos
PBS	do inglês, "*phosphate buffered saline*"
PC	Plasma comum
PC>24h	Plasma comum fracionado após 24 horas da coleta
PCIC	Plasma comum isento do crioprecipitado
PE	do inglês, "*phycoeritrin*"
PerCP	do inglês, "*peridini chlorophyll*"
PFC	Plasma fresco congelado
PFC24	Plasma fresco congelado dentro de 24 horas
PHA	do inglês, "*phytohemagglutinin*"
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPMI	do inglês, "*Roswell Park Memorial Institute*"
SCUP	Sangue do cordão umbilical
SD	do inglês, "*Standard deviation*"
SFB	Soro fetal bovino
ST	Sangue total
tPRP	Plasma rico em plaquetas ativadas por trombina

TRALI	do inglês, "Transfusion related acute lung Injury"
WHO	do inglês, “*World Health Organization”*
WJMSCs	Geleia de Wharton’s

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	**20**
1.1 Células mesenquimais estromais multipotentes.....	**20**
1.1.1 Marcadores.....	**20**
1.1.2 Características in vitro.....	**21**
1.1.3 Capacidade de diferenciação.....	**23**
1.2 Cultivo de células mesenquimais em condições isenta de xenoantígenos.....	**25**
1.2.1 Lisado Plaquetário.....	**27**
1.2.2 Soro Humano.....	**28**
1.3 Plasma obtido de Sangue Total.....	**29**
2 OBJETIVO.....	**32**
2.1 Objetivo geral.....	**32**
2.2 Objetivo específico.....	**32**
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	**33**
3.1 Critérios de seleção do plasma humano para produção do soro AB humano.....	**33**
3.2 Produção do soro AB humano	**33**
3.3 Cultivo e expansão das células mesenquimais.....	**34**
3.3.1 Meios de cultura.....	**34**
3.3.2 Cultivo em garrafas estáticas.....	**35**
3.3.3 Cultivo em microcarregador e frasco spinner.....	**36**
***3.4* Métodos analíticos.....**	**37**
3.4.1 Controle de qualidade do soro AB humano produzido.....	**37**
3.4.2 Quantificação celular.....	**39**

3.4.3 Caracterização do metabolismo celular..... **39**

3.4.4 Caracterização imunofenotípica das células mesenquimais..... **39**

3.4.5 Potencial de diferenciação em adipócitos e osteócitos..... **40**

3.4.6 Potencial de inibição da proliferação de linfócitos T..... **41**

3.4.7 Perfil citogenético..... **43**

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **45**

4.1 Produção dos lotes de soro AB humano..... **45**

4.2 Controle de qualidade dos lotes de soro AB humano produzidos..... **47**

4.3 Cultivo das células mesenquimais nos lotes de soro AB humanos produzidos em garrafas estáticas..... **56**

4.4 Cultivo das células mesenquimais utilizando soro AB humano em microcarregador e frascos *spinner*..... **62**

4.5. Caracterização imunofenotípica e funcional pós cultivo..... **67**

4.5.1 Caracterização imunofenotípica..... **67**

4.5.2 Avaliação do potencial de diferenciação em adipócito e osteócitos..... **69**

4.5.3 Avaliação do potencial de inibição da proliferação dos linfócitos **71**

4.5.4 *Análise citogenética*..... **74**

5 CONCLUSÕES..... **75**

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **76**

APÊNDICE A - Cinética de expansão celular no decorrer do cultivo em garrafas estáticas..... **85**

APÊNDICE B - Expansão celular em microcarregador e frasco *spinner*..... **92**

APÊNDICE C - Caracterização imunofenotípica das células mesenquimais..... **94**

APÊNDICE D – Inibição da proliferação dos linfócitos T..... **95**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células mesenquimais estromais multipotentes

As células mesenquimais estromais multipotentes (CMMs) foram descritas pela primeira vez em 1966 por Friedenstein como sendo células tronco não hematopoiéticas da medula óssea (MO) que formam colônias fibroblastóides aderentes ao plástico (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Estas células são atrativas para uso na terapia celular e na engenharia de tecidos por numerosas razões: a) são relativamente fáceis de serem isoladas de uma grande variedade de tecidos; b) expandem-se rapidamente em cultura; c) demonstram pequena diferenciação espontânea *ex vivo*; d) são multipotentes; e) ajudam a formar o estroma de sustentação da hematopoese e o processo de enxertia das célula tronco hematopoiéticas; f) são células potencialmente reguladoras do sistema imunológico; g) secretam numerosos fatores tróficos os quais modulam a inflamação, o remodelamento tecidual e a apoptose (BIEBACK, KINZEBACH et al, 2011).

As CMMs são, sem dúvida, um dos tipos mais promissores de células estaminais adultas atualmente sendo testadas em ensaios clínicos para uma ampla gama de doenças como, lesões no cérebro e na medula espinhal (PHINNEY, ISAKOVA, 2005), doenças cardiovasculares e infarto do miocárdio (ORLIC et al., 2001; YANG et al., 2010), diabetes tipo I (HU et al**.,** 2013), esclerose múltipla, doença de Crohn (LEE et al., 2013) doenças de tecidos cartilaginosos, lesões ósseas e doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) (LE BLANC et al., 2008; PHINNEY, PROCKOP, 2007).

1.1.1 Marcadores

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cellular Therapy)*, são três os requerimentos mínimos para uma população

de células ser classificada como CMMs. O primeiro é que as células sejam isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua aderência seletiva à superfície do plástico. A segunda é que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que os marcadores CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em osso, gordura e cartilagem (BYDLOWSKI, DEBES, MASELL et al., 2009).

1.1.2 Características in vitro

As CMMs podem ser isoladas por vários métodos, tradicionalmente, tem-se utilizado o método originalmente descrito por Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN et al., 1976) que se baseia na capacidade de aderência ao plástico das CMMs. Os tecidos na forma de suspensão líquida, como aspirado de medula óssea e sangue do cordão umbilical (SCUP), são processados utilizando gradiente de densidade para obtenção de células mononucleares. As células mononucleares isoladas são cultivadas com meio contendo soro fetal bovino (SFB). Algumas células da linhagem hematopoiética também podem aderir, mas, com o tempo, com as várias trocas do meio de cultura, são removidas. Portanto, este procedimento elimina a maior parte das células contaminantes e a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente com as diversas passagens. Após determinado número de passagens, a cultura torna-se enriquecida pela fração que se autorrenova, as CMMs. Estas células são fibroblastoides e possuem um formato fusiforme (COLTER et al., 2000; BYDLOWSKI et al., 2009). As CMM humanas têm como principal fonte a medula óssea. Entretanto, já foram isoladas de outros órgãos e tecidos como o sangue de cordão umbilical e placentário (ERICES, et al, 2000; LEE et al., 2004), o tecido adiposo (ZUK et al, 2001), endotélio e subendotélio da veia umbilical (COVAS et al., 2003), geleia de Wharton (MCELREAVERY et al., 1991; MITCHELL et al., 2003), vilosidade coriônica da placenta (FUKUSHI et al., 2004; IGURA et al., 2004) dentre outros.

Assim como as demais células animais em cultura, as CMMs apresentam um padrão sigmoide de atividade proliferativa que reflete a adaptação da cultura. As fases

de crescimento, como representado na Figura 1, podem ser divididas em fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log) de crescimento, fase estacionária ou platô e fase de declínio,

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

A fase inicial lag é um período de adaptação, ocorrendo aproximadamente nas primeiras 24 horas após inoculação das células no novo ambiente de cultivo (SHI et al., 2010). A duração dessa fase é menor em células provenientes de crescimento ativo, e mais longas quando proveniente de cultura quiescentes. As culturas iniciadas em baixa densidade celular apresentam maior duração da fase lag, o que é indesejável (SUN et al., 2010). Após adaptação, as células se dividem rapidamente, em período de proliferação ativa, caracterizando a fase exponencial de crescimento. Nesta fase as células estão em seu melhor estado fisiológico (FRESHNEY, 2005).

Durante seu crescimento inicial, as CMMs formam colônias denominadas unidades de colônias formadoras de fibroblastos (CFU-F), em analogia com as células-tronco hematopoiéticas. Apesar de não serem imortais, as CMMs têm a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade. Possuem tempo de duplicação dependente do doador do qual as células foram obtidas e da densidade de plaqueamento inicial. De fato, esta densidade é um parâmetro crítico para assegurar uma boa taxa de expansão e a manutenção do seu potencial de diferenciação. Alguns pesquisadores

demonstraram que, para algumas culturas, há necessidade de iniciá-las com uma densidade muito baixa (BYDLOWSKI et al., 2009).

Em culturas de células aderentes, como o caso das CMMs, o final da fase exponencial pode ser caracterizado pela confluência de cultura, onde as células apresentam inibição do crescimento, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para expansão celular. Porém, se muitas passagens são necessárias, isto pode alterar a qualidade das CMMs (BYDLOWSKI et al., 2009).

Na fase estacionária, a taxa de crescimento é reduzida, em razão das baixas concentrações de nutrientes e do acúmulo de metabólitos inibitórios. Pode haver aumento relativo na síntese de proteínas especializadas em vez de proteínas estruturais, além da modificação da constituição e da carga de superfície celular (FRESHNEY, 2005). Após, segue-se a fase de declínio, ou morte, que pode ser desencadeada por necrose ou apoptose. A necrose é considerada um mecanismo de morte acidental, decorrente de exposição a altos níveis de estresse. Já a apoptose, morte celular programada, ocorre de forma ordenada mediante ativação de processos bioquímicos e uma série de alterações morfológicas (FRESHNEY, 2005).

A determinação da curva de crescimento é importante para a avaliação das características de uma cultura celular. O comportamento e a bioquímica alteram-se significativamente em cada fase da curva. Com conhecimento do perfil de crescimento, pode-se verificar a concentração do inóculo mais adequado, duração do cultivo, intervalos apropriados para amostragem ou adição de reagentes a serem testados (MORAES et al., 2007).

1.1.3 Capacidade de diferenciação

As CMMs são células multipotentes que podem se diferenciar em diversos tipos de tecido, como mostrado na Figura 2. São capazes de formar osteoblastos (HAYNESWORTH et al., 1992; JAISWAL et al., 1997), condrócitos (MACKAY et al., 1998) e adipócitos (ZHAO et al., 2002) *in vitro* e *in vivo*. Em adição à identificação das CMMs baseadas em suas características morfológicas ou fenotípicas, a habilidade de células expandidas em formar estes três tipos celulares distintos é o único critério

funcional disponível para identificar CMMs genuínas e distingui-las de preosteoblastos, preadipócitos ou precondrócitos, que dão origem a somente um tipo celular (PITTENGER et al., 1999; LE BLANC, PITTENGER, 2005).

CMMs também são capazes de se diferenciar *in vitro*, sob condições apropriadas, em outras linhagens celulares, como tenócitos e células do mesoderma visceral (células endoteliais). Apesar de controverso, CMMs são relatadas como podendo se diferenciar em miócitos esqueléticos e cardiomiócitos (PROCKOP, 1997), e mesmo em células de origem não mesodérmica, como hepatócitos, células produtoras de insulina (CHEN, JIANG, YANG, 2004), e neurônios (BYDLOWSKI et al., 2009).

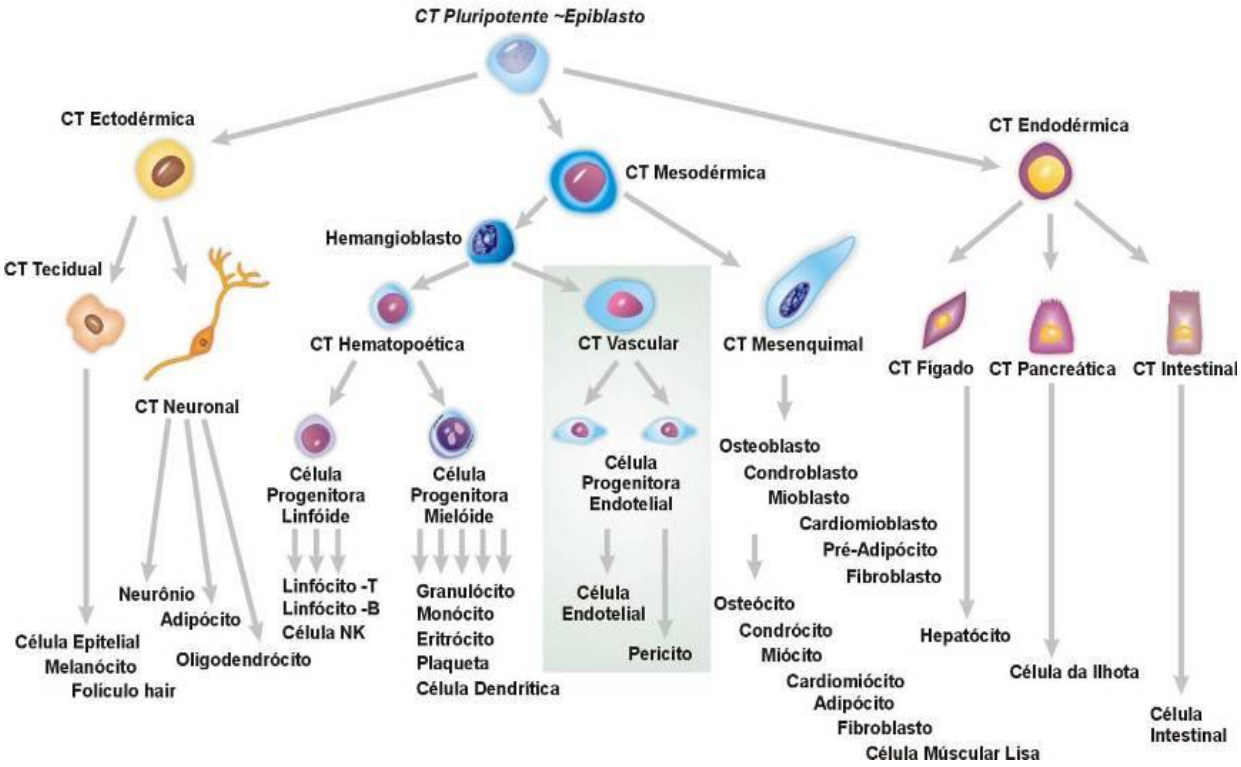


Figura 2. Ontogenia das células tronco (Adaptado de Caplan, 2007).

Diversos fatores, como métodos de isolamento, tipo de superfície da cultura, meio de cultura, densidade de plaqueamento, tratamento com diferentes fatores de crescimento e produtos químicos, afetam não somente a expansão e propriedades

imunogênicas das CMMs, mas também a diferenciação. A idade do doador de células, ou presença, ou estágio de doença também podem influenciar na qualidade das células (BYDLOWSKI, DEBES, MASELL et al., 2009)

1.2 Cultivo de células mesenquimais em condições isenta de xenoantígenos

As células mesenquimais estromais multipotentes humanas são expandidas atualmente através de culturas aderentes na presença de SFB.

O SFB proporciona um elevado teor de fatores estimuladores de crescimento, bem como fatores nutricionais, físicos e químicos necessários à manutenção e crescimento celular. Além disso, o SFB desempenha um papel na disponibilização de fatores essenciais à aderência das células na cultura, que é um pré-requisito para o crescimento das CMMs. Embora o meio de cultura suplementado com SFB continue sendo o padrão na geração CMMs para pesquisa básica e estudos clínicos, preocupações foram levantadas devido aos problemas potenciais associados ao uso de SFB, incluindo questões de segurança (JUNG, KRISHNA et al., 2012).

A suplementação do meio de cultura com SFB apresenta como desvantagens: alto custo (este suplemento é um dos componentes de maior valor agregado no meio de cultivo, representando 70-85% do custo do meio); variabilidade do produto lote a lote, o que dificulta a padronização do meio e a própria reprodutibilidade do cultivo; citotoxicidade de fatores não caracterizadas no soro; risco de possível contaminação com vírus, príons, bactérias, micoplasma, leveduras, fungos, endotoxinas e outros patógenos conhecidos e desconhecidos. Certos componentes do soro geralmente melhoram adesão e propagação celular, mas podem, ocasionalmente, inibir o crescimento de células em quantidades variáveis: (1) imunoglobulinas, (2) os fatores de transcrição (ATF-2, SRE-ZBP, GATA-2, TFIID, Ets- 1/Ets-2, E2F-1, Oct-2, p53, AP-2), e (3) fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas, semelhante a fatores de crescimento de insulina, o fator de crescimento epidérmico, o fator de crescimento de fibroblastos, o fator de crescimento dos nervos). Estes componentes podem intervir na função celular, crescimento, e estabilidade genotípica/fenotípica das células cultivadas *in vitro* (BIEBACK, HECKER et al., 2009).

Além disso, algumas proteínas e peptídeos podem ser incorporados durante o cultivo o que gera um risco de xenoimunização e de reação anafilática, principalmente se várias infusões são necessárias (SUNDIN, RINGDEN, SUNDBERG et al., 2007; MACKENSEN, DRAGER, SCHLESIER et al., 2000; SHIH, BURNOUF, 2015), o que pode ter como consequência a rejeição das células transplantadas. Como exemplo, Mackensen e colaboradores relataram reações anafiláticas e geração de anticorpos anti-IgG e IgM em pacientes que receberam células dendríticas cultivadas em meio contendo SFB (MACKENSEN, DRAGER, SCHLESIER et al., 2000). Estas reações foram observadas mesmo após a lavagem das células antes da infusão (SHIH, BURNOUF, 2015).

Além das limitações acima citadas, outra grande desvantagem de uso do SFB envolve aspectos éticos relacionados ao método desumano da coleta do sangue. O método mais utilizado é a punção cardíaca, sem anestesia, com o animal ainda vivo. Outro fato preocupante é que na idade gestacional mais adequada para a coleta (em torno de seis meses de desenvolvimento fetal) é descrito que o bezerro desenvolve a consciência de dor e angústia. Em média, cerca de 1.000.000 fetos de bezerros são mortos a cada ano para a coleta de cerca de 500.000 litros de SFB (TEKKATTE, GUNASINGH, CHERIAN et al., 2011). Sérias preocupações éticas foram levantadas sobre o bem-estar do feto doador na coleta, produção e processamento do SFB (SHAILER, CORRIN, 1999; VAN DER VALK et al, 2004).

Por estas razões, em 1997 a Organização Mundial da Saúde publicou um memorando recomendando, quando possível, não utilizar produtos de origem animal na produção de insumos que possam ser utilizados em humanos (*World Health Organization*, WHO, 1997). Outras diretrizes regulatórias também reforçam a necessidade de uso de produtos xenoantigênicos (HALME, KESSLER, 2006).

Em função do acima exposto, tem sido recomendado que novos suplementos sejam testados no cultivo das CMMs destinadas à terapia celular como alternativa ao SFB. Neste sentido, tem-se buscado fontes proteicas de origem humana, como por exemplo, o plasma, soro autólogo ou alogênico, lisado plaquetário (BIEBACK, HECKER, KOCAOMER et al., 2009) e soro proveniente de sangue do cordão umbilical (PHERMTHAI et al., 2011, JULAVIJITPHONG et al., 2014). Estes derivados de sangue humano têm sido considerados como a alternativa mais segura e prática ao uso de SFB nos protocolos clínicos (BIEBACK, 2013). O processo de produção destes

suplementos deve ser realizado sob condições assépticas, numa sala limpa e sob condições GMP (*Good Manufacturing Practice*), evitando a contaminação e assegurando a sua qualidade.

1.2.1 Lisado Plaquetário

O lisado plaquetário (LP) é um concentrado de fatores de crescimento produzido pelas plaquetas ressuspenso em um pequeno volume de plasma (BERNARDO, AVANZINI et al., 2007). Diferentes fontes têm sido utilizado para obtenção do LP: aférese (DOUCET, ERNOU et al., 2005; BERNARDO, AVANZINI et al., 2007; SALVADE, DELLA MINA et al., 2010), concentrado de plaquetas obtido do *buff-coat* (camada leucoplaquetária) do sangue total (SCHALLMOSER, BARTMANN et al., 2007; BIEBACK, HECKER et al., 2009), plaquetas obtidas do sangue total (SALVADE, DELLA MINA et al., 2010) onde faz-se necessário a leucorredução do produto (SCHALLMOSER, BARTMANN et al., 2007; BIEBACK, HECKER et al., 2009). Os concentrados de plaquetas têm validade de 5 dias, é recomendável que seja utilizado o quanto antes possível após a produção (DOUCET, ERNOU et al., 2005), mas é possível a utilização das plaquetas armazenadas no 4º ou 5º dias após a sua produção (BIEBACK, HECKER et al., 2009).

Para a produção do LP, é indicado que se ajuste a concentração de plaquetas para 10^9 plaquetas/mL de plasma, para assegurar a liberação dos fatores de crescimento. Já foi relatada a expansão eficiente de CMMs em LP produzido com menor concentração de plaquetas (DOUCET, ERNOU et al., 2005; BERNARDO, AVANZINI et al., 2007; SALVADE, DELLA MINA et al., 2010). As plaquetas podem ser lisadas por meio do congelamento, conforme protocolo descrito por Schallmoser e colaboradores (2007), onde o Plasma rico em plaquetas (PRP) é congelado a temperaturas entre -30ºC a -80°C e subsequentemente descongelado a 37°C para se obter os fatores de crescimento liberados. O LP é centrifugado para remoção dos fragmentos plaquetários.

Este produto tem sido muito utilizado para a expansão de células mesenquimais para uso clínico. Amable e colaboradores (2014) demonstraram que

10% LP induziu de cinco a dez vezes uma maior proliferação celular em comparação com 10% de soro fetal bovino. Várias concentrações para suplementação já foram testadas, e foi determinado que a de 5% é melhor, promovendo uma eficiente proliferação das CMM de forma econômica (DOUCET, ERNOU et al., 2005). A suplementação do meio com 10% de SFB pode ser substituída por 5% de LP sem comprometimento do crescimento e das propriedades funcionais das células (SHIH, BURNOUF, 2015).

1.2.2 Soro Humano

Outra alternativa promissora para a cultura de células mesenquimais humanas é a substituição de SFB com Plasma AB humano convertido em soro, o qual é rotineiramente testado quanto à contaminação viral. O soro humano suporta a propagação de osteoblastos, condrócitos humanos, e células da medula óssea, bem como células de glioma e melanoma. Estudos recentes sugerem que o soro humano pode ser um bom candidato para substituir SFB como um suplemento para a cultura de células (CÁNOVAS, BIRD, 2012; KOCAOEMER et al., 2007).

Bieback e colaboradores avaliaram algumas características das CMMs cultivadas na presença do soro humano ou SFB a 10%. Relataram que as células apresentaram cinética de crescimento, qualidade e potência similares (BIEBACK, HECKER, KOCAOMER et al., 2009).

Para a obtenção do soro humano pode se utilizar o plasma, fracionado durante o processamento do sangue total (ST), que já se encontra congelado e estocado nos bancos de sangue (PYTLIK, STEHLIK et al., 2009) ou estimular a doação de ST em bolsas sem anticoagulante (BIEBACK, HECKER, KOCAOMER et al., 2009). No primeiro protocolo, ao plasma previamente descongelado são adicionados 0,1 M de $CaCl_2$ em uma proporção de 9:1. A seguir, a mistura é incubada durante 180 min à temperatura ambiente. Os coágulos de fibrina são removidos por meio de filtração através de filtro de metal, o produto é incubado durante 48 horas, a 4 º C. Após a remoção de fibrina residual, o soro é esterilizado por filtração e as alíquotas são armazenadas a -20ºC até a sua utilização (PYTLIK, STEHLIK et al., 2009). No

segundo protocolo, as bolsas com sangue total são armazenadas em geladeira a 4º C, por pelo menos 12 horas, para permitir a coagulação do plasma. A seguir, o soro humano é separado por centrifugação, esterilizado por filtração e congelado em alíquotas até o momento do uso. Em geral, um lote de soro humano preparado para uso como suplemento proteico no cultivo das CMMs, utiliza pools de pelo menos 5 doadores para minimizar as variações individuais entre os mesmos (BIEBACK, HECKER, KOCAOMER et al., 2009). O uso de plasmas fracionados de bancos de sangue, permite aproveitar o uso do concentrado de hemácia para fins terapêuticos. O soro também pode ser obtido a partir do sangue de cordão umbilical. Julavijitphong e colaboradores demonstraram que o soro humano a partir de sangue do cordão umbilical (hUCS) é um suplemento eficaz para expansão de CMM derivada da geleia de Wharton (WJMSCs), porém, tem um rendimento limitado por ser obtido de um volume pequeno de cada doador.

1.3 Plasma obtido de Sangue Total

Os componentes plasmáticos são produzidos a partir de sangue total coletados em bolsas plásticas com sistema fechado e estéril destinado especificamente para esta finalidade. No Brasil a Agência da Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão normativo que regulamenta os procedimentos da atividade hemoterápicas, por meio da RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 2.712 de 12 de novembro de 2013. Esta define, juntamente com os princípios e diretrizes da Política Nacional do Sangue, diretrizes para a produção do sangue e derivados para uso clínico.

Normalmente são colhidos um volume aproximado de 450 ± 45 mL de sangue total contendo 60-65mL de anticoagulante. Após a coleta, o sangue é fracionado por centrifugação para a separação dos componentes sanguíneos: concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas e o plasma. O tempo de fracionamento e as condições de armazenamento influenciam no produto plasmático final que será produzido (BRASIL, Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013).

Dentre os componentes plasmáticos pode-se obter: a) Plasma fresco congelado (PFC); b) Plasma fresco congelado dentro de 24 horas (PFC24); c) Plasma

comum isento do crioprecipitado (PCIC); d) Plasma comum, não fresco, normal ou simples (PC); e e) Crioprecipitado (CRIO) (BRASIL, Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013).

O PFC é o plasma fracionado em até 6 horas e totalmente congelado em até 8 horas após coleta, atingindo temperaturas iguais ou inferiores a -30°C. O PFC24 é o plasma obtido do sangue total mantido refrigerado, fracionado em até 18 horas e congelado completamente entre 8 e 24 horas após a coleta, atingindo temperaturas iguais ou inferiores a -30°C. Os PFC e PFC24 podem ser utilizados em pacientes para fins terapêuticos com o objetivo de reposição de fatores de coagulação deficientes (deficiências múltiplas ou específicas na ausência do fator purificado) (BRASIL, Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013).

O PCIC é o plasma do qual foi retirado, em sistema fechado, o crioprecipitado. A Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) é a única indicação clínica possível para o PCIC. O PC é o plasma cujo congelamento não se deu dentro das especificações técnicas, ou, ainda, resultado da transformação de um PFC, de um PFC24 ou de um PCIC cujo período de validade expirou. O PC não pode ser utilizado para transfusão, devendo ser exclusivamente destinado à produção de hemoderivados (BRASIL, Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013).

O CRIO é a fração de plasma insolúvel em frio, obtida a partir do plasma fresco congelado, contendo glicoproteínas de alto peso molecular, principalmente fator de VIII, fator de von Willebrand, fator XIII e fibrinogênio. Para a obtenção do CRIO, o PFC deve ser descongelado a 4 ± 2°C e imediatamente centrifugado nessa mesma temperatura (BRASIL, Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013).

O sobrenadante pobre em crioprecipitado (plasma isento de crioprecipitado) deve ser extraído, em circuito fechado, permanecendo um volume de até 40 mL junto ao material insolúvel em frio. O crioprecipitado resultante deve ser recongelado em até uma hora após a sua obtenção (BRASIL, Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013). O processo de fracionamento do sangue total para obtenção dos hemocomponetentes pode ser obervada na Figura 3.

O Hemocentro de Ribeirão Preto obtém do uma média anual de (33.000) plasmas fracionados. Aproximadamente 19 % dos plasmas (6.300) são do tipo comum (PC>24h e PCIC) e não são utilizados para fins terapêuticos, sendo, portanto, encaminhados a indústria para a produção de hemoderivados. Em função disso, os

mesmos foram selecionados para serem utilizados no presente trabalho para a produção do soro AB que foi utilizado no cultivo das células CMMs.

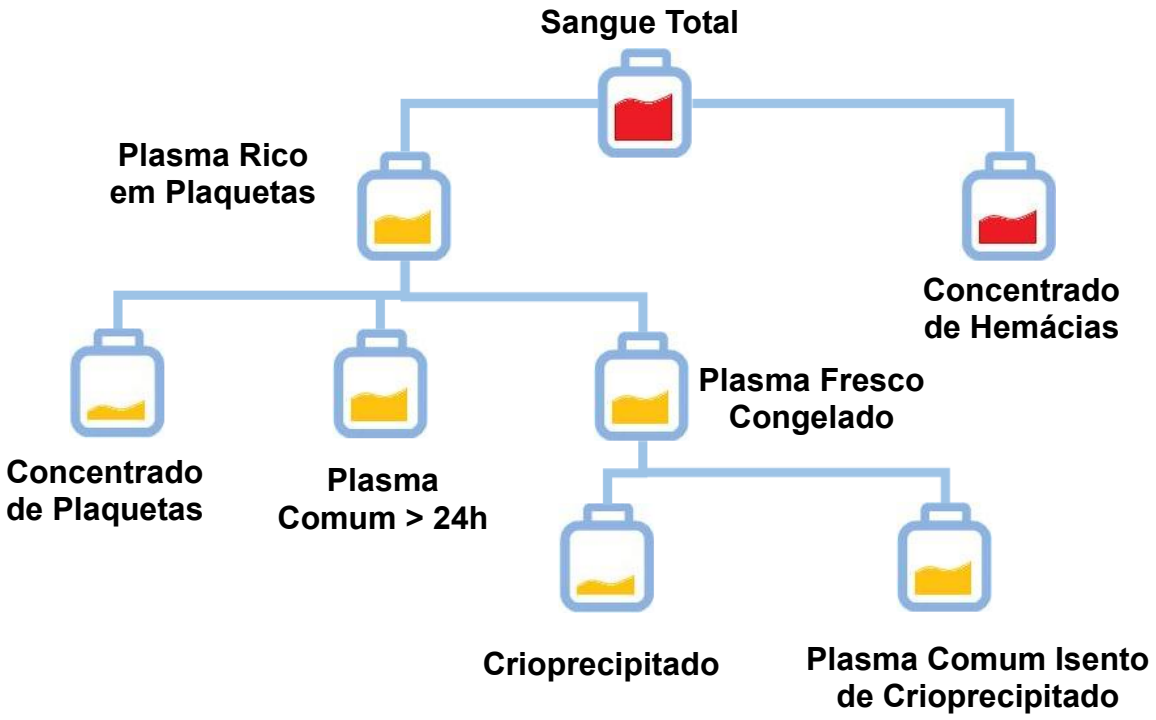


Figura 3: Representação simplificada do processo de fracionamento do sangue total para obtenção dos hemocomponentes.

2 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi produzir soro AB humano e avaliar a sua qualidade e eficácia como substituto do soro fetal bovino na produção de células mesenquimais destinadas à terapia.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a melhor fonte de plasma para a produção de soro AB humano: plasma comum fracionado após 24 horas da coleta (PC>24h) ou plasma comum isento de crioprecipitado (PCIC);
- Avaliar a qualidade do soro produzido quanto a esterilidade, níveis de endotoxinas, composição bioquímica, níveis de hemoglobina livre e variação do pH;
- Avaliar a reprodutibilidade lote a lote, bem como o prazo de validade deste produto;
- Avaliar o efeito da suplementação com o soro AB humano produzido no cultivo de células mesenquimais em culturas estáticas (garrafas de cultivo) e agitadas (frascos *spinner* e microcarregadores) e comparar com a condição padrão, meio suplementado com SFB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Critérios de seleção do plasma humano para produção do soro AB humano

Para a produção do Soro Humano convertido foram utilizadas bolsas de plasma comum fracionado após 24 horas (PC>24h) ou plasma comum isento de crioprecipitado (PCIC) provenientes de coletas fornecidas pelo Hemocentro de Ribeirão Preto, doadas através de um termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética do HCFMRP-USP (CAAE: 15694613.5.1001.5440).

Foram selecionados plasmas de acordo com as seguintes características:

a) Tipagem sanguínea AB positivo e AB negativo;
b) Pesquisa de anticorpo irregular negativo;
c) Testes sorológicos negativos para: Hepatite B (HBsAg e anti-HBc), Hepatite C, vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipo 1 e tipo 2, doença de chagas, sífilis, vírus linfotrópico da célula humana (HTLV) tipo 1 e tipo 2;
d) Testes moleculares negativos para: Teste de ácidos nucleicos (NAT) para HIV e Hepatite C;
e) Doadores do sexo masculino ou doadora do sexo feminino sem histórico gestacional, a fim de evitar reação por TRALI (do inglês, *Transfusion related acute lung Injury*);
f) Análise visual: plasma límpido (não lipêmico) e sem hemólise.

3.2 Produção do soro AB humano

Para o processo de produção do soro humano, foi utilizado o protocolo descrito por Pytlik e colaboradores (2009) com algumas modificações. Para cada lote, seis unidades de PC tipo AB foram descongeladas em banho-maria a 37ºC e transferidos para uma bolsa plástica estéril com capacidade de 2L com auxílio de dois equipos

para administração de soluções intravenosa previamente conectados entre si por meio de um aparelho de conexão estéril. A este pool de plasma humano foi acrescentado $CaCl_2$ 0,1M na proporção de 9:1. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por aproximadamente três horas. A seguir, os coágulos de fibrina formados foram removidos por filtração (170µm) através de um equipo para transfusão de sangue em câmara dupla, previamente soldado a outro equipo, sendo transferido o soro filtrado para uma nova bolsa de 2L, no qual o soro AB humano foi reincubado por 48 horas a 4ºC (2 a 6ºC). Ao final deste período o soro AB humano foi novamente filtrado (filtro 170µm) para remover os coágulos de fibrina residuais e, a seguir, esterilizado por filtração (0,2µm). O soro AB humano produzido foi aliquotado em tubos de polipropileno e estocado em freezer a temperatura inferior a 20ºC negativos até o momento do uso.

3.3 Cultivo e expansão das células mesenquimais

Foram utilizadas CMMs humanas derivadas do cordão umbilical provenientes de um banco existente no Hemocentro de Ribeirão Preto (HCRP nº14906/2010) estabelecido pela Dra. Karen de Lima Prata (“Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular”, Processo HCRP 920/2009).

3.3.1 Meio de cultura

Para o cultivo das CMMs foi utilizado o meio de cultura α-MEM (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA) acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Penicillin – Sterptomycin, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA), 2,6 g/L de Hepes (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA) e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (Merck, São Paulo, SP, Brasil). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Fetal Bovine Serum Characterized - HyClone™, Logan, UT, EUA) como condição controle e 10% de soro AB humano convertido produzido neste trabalho.

3.3.2 Cultivo em garrafas estáticas

As células criopreservadas foram descongeladas e transferidas para frascos de cultura de 75 cm^2 com 15 mL de volume de meio, na concentração de $1,5x10^5$ células/mL e mantidas em incubadora a 37° C e 5% de CO_2, com troca de 50% do meio a cada 3 dias aproximadamente. Após atingir a confluência de aproximadamente 90%, as células foram desaderidas com Tryple® e centrifugadas.

O cultivo das CMMs suplementadas com cada lote de soro AB humano produzido foi realizado em duplicata sendo inoculadas $1,5x10^5$ cel/mL para cada passagem realizada. As CMMs foram cultivadas a partir da quarta passagem e monitoradas até a sétima passagem. O procedimento experimental adotado encontra-se representado na Figura 4.

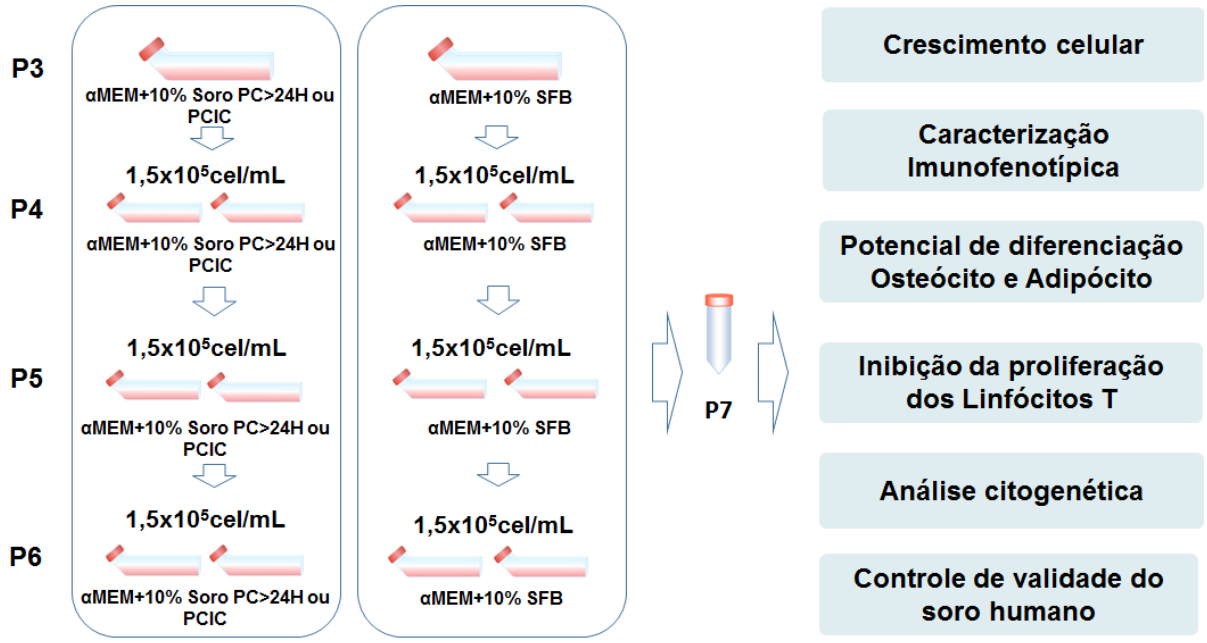


Figura 4: Representação esquemática do procedimento experimental adotado para cultivo de CMMs em garrafa estática durante a realização do trabalho.

3.3.3 Cultivo em microcarregador e frasco spinner

Além do cultivo em garrafas estáticas, foi avaliado o cultivo em condições agitadas, em frascos *spinner* utilizando o microcarregador poliestireno P102-L (HyClone™, Logan, UT, EUA) na concentração de 5,0 g/L. Este sistema foi selecionado por ser escalonável e permitir a produção de grandes quantidades de células em um ambiente de cultivo mais homogêneo. As etapas de preparação do microcarregador, hidratação, lavagem e esterilização, foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Após obtida a quantidade de células adequadas através do cultivo em garrafas estáticas, as células foram inoculadas nas concentrações de $2{,}0 \times 10^5$ células/mL, no frasco *spinner* de 250mL contendo 100mL de meio de cultura e microcarregadores.

Para a fase de adesão das células e adaptação ao novo ambiente, nos primeiros três dias a agitação foi mantida intermitente: agitação a 30 rpm por 2 minutos seguido de um período de repouso de 15 minutos. Após a fase de adesão, a agitação foi mantida constante a 30 rpm até o final do experimento. Os frascos *spinner* foram mantidos em incubadora a 37°C, 5% de CO_2 e 85% de umidade sob agitador magnético (Thecne, Reino Unido). Realizou-se a partir do terceiro dia de cultivo a troca diária de 50% do meio de cultura. Diariamente foram coletadas amostras para avaliação do crescimento e metabolismo celular.

Após 8 dias de cultivo, as células foram coletadas e tripsinizadas, com Tryple 10X + 2% colagenase, para quantificação celular e caracterização imunofenotípica e funcional das células. O procedimento experimental adotado encontra-se representado na Figura 5.

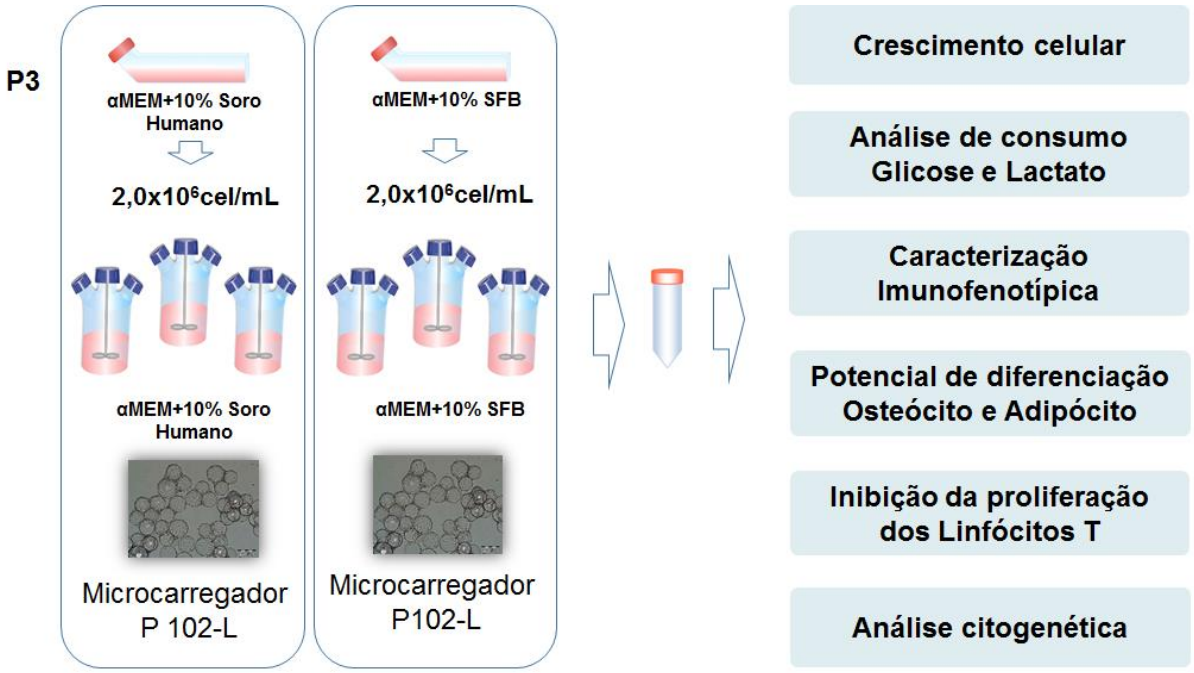


Figura 5: Representação esquemática do procedimento experimental adotado para cultivo de CMMs em microcarregador e frasco *spinner*.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Controle de qualidade do soro AB humano produzido

Para garantir a qualidade e a reprodutibilidade lote a lote, bem como identificar possíveis alterações que pudessem comprometer a efetividade do soro AB humano produzido, diversos parâmetros analíticos foram avaliados.

- **Esterilidade:** Para determinação da esterilidade foram realizados teste para detecção de bactérias, fungos e micoplasma. A análise para detecção de micoplasma foi realizada utilizando o kit comercial MycoAlert^{TM} (Lonza, Rockland, ME, USA), um teste bioquímico seletivo que explora a atividade de enzimas do micoplasma que são encontradas na grande maioria das 180 espécies de micoplasma, mas não estão presentes em células eucarióticas. A detecção de bactérias e fungos foi realizado por

hemocultura pelo Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT (BioMérieux, Paris, França). Após a filtragem do soro AB produzido, 4 mL foram inoculados com auxílio de uma seringa e agulha estéril no frasco de hemocultura BacT/ALERT® PF e incubado no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT por 14 dias até a finalização do teste.

- **Determinação de endotoxinas:** Para determinação da endotoxina foi utilizado o kit LYSATE ENDOSAFE® - PTS CARTRIDGES (Charles River Endosafe, Charleston, SC, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

- **Dosagem de Hemoglobina Livre:** A dosagem de hemoglobina livre presente no soro foi obtida através da leitura por espectrofotometria SPECTRONIC® GENESYS™ 2PC (SPECTRONIC INSTRUMENTS, UK) e analisada através do *software* WinSpec disponível no Hemocentro de Ribeirão Preto.

- **Análise bioquímica:** A análise bioquímica foi realizada pelo Laboratório Central de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foram obtidas as dosagens de proteína total, sódio, potássio, ferro, fosfatase alcalina, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), cloreto, glicose, gama GT, ácido úrico, ureia, colesterol, triglicérides e cálcio. O valor da osmolalidade plasmática foi obtida utilizando a fórmula:

  [Osmolalidade plasmática = (2 x Sódio) + Glicose/18 + Uréia/6].

- **Análise do pH:** A análise do pH das amostras de soro AB produzidas foi realizada utilizando o pHmêtro ORION™ 720 A+ (Thermo Scientific, Whaltam, MA, EUA) no momento da suplementação do meio de cultura (após o congelamento do soro).

3.4.2 Quantificação celular

A densidade celular foi determinada, nos cultivos realizados em garrafas estáticas com o contador automático de células MINDRAY BC-2800 *Auto Hematology Analyzer* (Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd., Nanshan, Shenzhen, China) disponível no Hemocentro de Ribeirão Preto.

Nos cultivos realizados em frasco *spinner* a quantificação celular foi realizada por contagem em câmara de Neubauer (hemacitômetro) após diluição 1:2 com solução de azul de tripan 0,4%.

3.4.3 Caracterização do metabolismo celular

A análise do consumo de glicose e produção de ácido láctico nos cultivos em microcarregador foram realizadas pelo analisador bioquímico YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyser (YSI Life Sciences, USA).

3.4.4 Caracterização imunofenotípica das células mesenquimais

Na terceira passagem após serem cultivadas nos meios suplementados com os lotes de soros AB produzidos, amostras de CMMs foram analisadas em relação a seus antígenos de superfície celular, por meio de marcação com anticorpos monoclonais específicos (imunofenotipagem).

A caracterização imunofenotípica das células mesenquimais foi realizada por citometria de fluxo com auxílio do aparelho FASCalibur™ (Bacton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os dados foram analisados com o *software* CELLQuest™ (Bacton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

Para este ensaio foi utilizado um painel de 11 anticorpos monoclonais (BD-Pharmingen): CD14, CD90, CD73, CD166 conjugados com PE (do inglês, *phycoeritrin*), CD45, CD31, CD146, HLA-ABC conjugados com FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*), CD105, CD34, HLA-DR conjugado com PerCP (do inglês, *peridini chlorophyll*). Como controle dessas análises, foram utilizados isótopos de imunoglobulina G conjugados com FITC, PE e PerCP.

As CMMs foram subdivididas em alíquotas de 100µL de suspensão celular em PBS 1X na concentração de $1x10^5$ células/tubo. Foram adicionados 5µL de anticorpo monoclonal marcado com fluorocromos e as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Após a marcação, foram acrescidos 2mL de PBS 1X em cada tubo e os mesmos foram centrifugados a 500x g por três minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* celular foi ressuspenso em 200µL de PBS 1X e analisado imediatamente no citômetro de fluxo. Foram analisados 10.000 eventos celulares para cada marcação imunofenotípica e foram gerados gráficos de histograma para imunomarcação e em "*Dot Plot*" para definição do tamanho/granularidade internos.

3.4.5 Potencial de diferenciação em adipócitos e osteócitos

A avaliação do potencial de diferenciação das células foi realizada para verificar se suplementação com o soro AB produzido alterava essa propriedade das CMMs.

Foram induzidas a diferenciação em adipócitos e osteócitos uma alíquota de 1mL contendo 40.000 células (adipócito e osteócito) e 5.000 células (controle) cultivadas em placas de cultura de 24 poços com lamínulas. A diferenciação foi iniciada pós 24 horas do início do cultivo. Primeiramente, todo o meio foi removido e adicionado 1mL de meio de indução (adipócitos e osteócitos) ou somente o meio α-MEM suplementado com 15% SFB (Hyclone™, Logan, UT, EUA)) como controle. As amostras foram cultivadas até a diferenciação celular em estufa úmida a 37ºC com 5% de CO_2 e monitoradas sob microscopia invertida. Para a diferenciação de adipócitos foi adicionado o meio α-MEM suplementado com 15% SFB (Hyclone™,

Logan, UT, EUA)), 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). Para diferenciação em osteócitos, foi adicionado ao meio α-MEM suplementado com 7,5% SFB (Hyclone™, Logan, UT, EUA), 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). O meio devidamente suplementado foi trocado a cada 3 dias.

Após 3 a 4 semanas, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeido a 4% por 30 minutos em temperatura ambiente, lavados em água destilada e incubados em álcool 70% por dois minutos. A seguir, foram coradas com Sudan II escarlate (MERCK, Alemanha) por cinco minutos, lavadas com álcool 70% e em água corrente e coradas com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas em glicerina, podendo ser visualizados os depósitos de gordura. As células diferenciadas em osteócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeido a 4% por 30 minutos, em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e coradas com nitrato de prata a 5%, no escuro, por 30 minutos. Em seguida, foram novamente lavados com água destilada e expostas à lâmpada de 100W por 60 minutos (coloração Von Kossa). As células foram então lavadas rapidamente com tiossulfato de sódio a 5%, contracoradas com hematoxilina de Harris por duas vezes, e, a seguir, montadas em Permount SP 15, podendo ser observados os depósitos de cálcio.

3.4.6 Potencial de inibição da proliferação de linfócitos T

O potencial de inibição da proliferação de linfócitos T das CMMs foi avaliado após o cultivo na sétima passagem. Foram utilizados aproximadamente $1,5x10^6$ células ressuspensas em 3mL de meio α-MEM + 10% SFB, objetivando uma concentração final de $5x10^5$ células/mL. A suspensão celular foi plaqueada nas concentrações $2,5x10^5$; $1,0x10^5$ e $0,5x10^5$ na placa de 24 poços (1mL/poço) e

incubada por no mínimo 4 horas, a 37ºC e 5%CO_2, de modo a permitir a adesão das células à placa.

Paralelamente foram isoladas células mononucleares (CMN) de sangue periférico coletado sempre de um mesmo doador voluntário sadio, no contexto do projeto aprovado pelo comitê de ética do HCFMRP-USP (CAAE: 15694613.5.1001.5440). As CMN foram colhidas na presença de heparina sódica – 14/UI/mL por centrifugação em gradiente de densidade de 1,077g/mL (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia). Em um tubo de polipropileno de 50mL, as amostras de sangue periférico foram diluídas 1:2 em PBS 1X, em um volume final de 30mL. A seguir, 13mL de Ficoll-Paque™ foram acrescentados lentamente no fundo de cada tubo para não misturar as soluções. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 931 x *g* à temperatura ambiente de 22ºC, sem freio. O anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado e transferido para outro tubo. Às células foi acrescentado PBS 1X até o volume final de 50mL. A suspensão foi então centrifugada por 10 minutos a 524 x *g*, sem freio a 22ºC e o sobrenadante foi desprezado, para homogeneização do *pellet* celular acrescentado PBS 1X até o volume final de 50mL. As células foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 524 x *g*, sem freio a 22ºC e ressuspendidas em 2mL de PBS + 0,1% albumina humana.

Foram separadas no mínimo $2x10^7$ células/mL para marcação com 2,5µM CFSE (do inglês, *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Molecular Probes, USA) (controle não marcado – $3x10^6$ células) durante 10 minutos à 37ºC. A marcação foi imediatamente interrompida por adição de 5 volumes de meio RPMI + 10% SFB gelado e as amostras incubadas por 5 minutos no escuro em gelo. As células foram, então, lavadas 3 vezes com 20mL de RPMI + 20% SFB e ressuspensas no mesmo meio na concentração de $5x10^5$ células/mL.

As células foram plaqueadas sob as células mesenquimais já aderidas nas seguintes concentrações:

- CMM controle – $1x10^5$ células: 200 µL da suspensão celular + 800µL de meio α-MEM
- CMM:CMN 1:2 - 500 µL da suspensão celular + 500µL de meio α-MEM
- CMM:CMN 1:5 - 200 µL da suspensão celular + 800µL de meio α-MEM

- CMM:CMN 1:10 - 100 µL da suspensão celular + 900µL de meio α-MEM

A seguir, as CMN foram estimuladas com 5µL de PHA (Sigma-Aldrich) na concentração de 1mg/mL. As células foram incubadas por cinco dias no escuro (em papel alumínio, para evitar perda de fluorescência do CFSE), a 37ºC e 5%CO_2. Após 12 a 18 horas 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 deste período, as células foram coletadas, transferidas para tubos 12 x 75 mm e centrifugadas a 500 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular marcado com 5µL de anticorpo monoclonal anti CD3-APC durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 2mL de PBS 1X. As amostras foram centrifugadas 500 x *g* por 5 minutos, ressuspensas em 200µL de PBS 1X e 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 CMN. Foram realizadas triplicatas de cada uma das condições de cultivo.

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

3.4.7 Perfil citogenético

O perfil citogenético das CMMs foi avaliado após cultivo em P7 em cada meio suplementado com soro AB humano com tempo de estoque de 12 meses.

As células provenientes do cultivo foram mantidas em garrafas estáticas até a confluência de aproximadamente 70%. Para interromper o ciclo celular e obter as metáfases, foi acrescentado 150µL de bloqueador de fuso mitótico colcemid® (N-deacetyl-N-Methylcolchine) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) na concentração de

0,10µg/mL. Em seguida as garrafas foram mantidas na estufa com 80% de umidade, a 37°C e 5% de CO_2 durante 8 horas. Após incubação, as CMMs foram tripsinizadas de forma convencional com Tryple®, e com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, a suspensão celular foi transferida para um tubo de 15mL e centrifugadas a 800rpm por 10 minutos.

O sobrenadante das culturas foi removido e foi adicionado ao *pellet* celular 5mL de solução de KCl 75mM previamente aquecido a 37°C. As amostras foram homogeneizadas, incubadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos e posteriormente centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e o material foi fixado em solução de Carnoy (metanol e ácido acético 3:1, Merck) por 10 minutos, centrifugado a 800 rpm por 10 minutos. Foram realizadas três lavagens com o fixador e as amostras foram ressuspensas em 1mL do fixador Carnoy.

Após a fixação, as amostras foram gotejadas em lâminas de vidro. As bandas foram feitas pela técnica de bandeamento G com tripsina e corante *Wright's eosine methylene blue*. As metáfases foram analisadas ao microscópio óptico Zeiss AXIO Imager 2 acoplado ao sistema de captura de imagem Applied Spectral Imaging para cariotipagem, e sempre que possível, pelo menos 20 metáfases foram analisadas. Os cariótipos foram descritos de acordo com os critérios internacionais de nomenclatura cromossômica *International Sistem for Human Citogenetic Nomenclature* – ISCN, 2013.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção dos lotes de soro AB humano

Foi selecionado o Plasma Comum como fonte para a produção de soro AB humano por não ser indicado para tratamento clínico, sendo enviado às indústrias produtoras de hemoderivados. O tipo sanguíneo AB é isento de anticorpos anti-eritrocitário do sistema ABO, por este motivo o mais indicado para a produção do soro humano, afim de evitar a reação cruzada no cultivo celular (MOLL G, HULT A, BAHR LV, et al., 2014).

Para a produção do soro, é preferível que se selecione os plasmas de doadores do sexo masculino, para evitar o risco de TRALI (do inglês, *transfusion-related acute lung injury*), que é considerada uma séria complicação relacionada à transfusão de hemocomponentes que contêm plasma. É caracterizada por insuficiência respiratória aguda, edema pulmonar bilateral e severa hipoxemia, sem comprometimento cardíaco, ocorrendo dentro de 6 horas, após transfusão. Anticorpos presentes no plasma do doador são direcionados contra antígenos específicos de neutrófilos humanos (HNA) e/ou antígenos leucocitários humanos (HLA) do paciente, são na maioria dos casos provenientes de doadoras multíparas (com 3 ou mais gestações), que são frequentemente imunizadas contra antígenos leucocitários durante a gravidez (POPOVSKY, MOORE, 1985; BUX, 2005; SACHS, KAUSCHAT, BEIN, 2005).

Foram produzidos três lotes de soro AB humano obtidos de pools de Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas após coleta do sangue total (PC>24h) e três lotes de soro AB humano obtidos de pools de Plasma Comum Isento de Crioprecipitado (PCIC). Cada pool foi formado por bolsas de plasmas de seis doadores diferentes. A quantidade de soro AB humano obtida a partir de cada pool bem como o rendimento do processo de produção podem ser observados na Tabela1.

Tabela 1 - Quantidade e rendimento dos lotes de soro AB humano produzidos a partir de plasma comum fracionado a mais de 24 horas (PC>24h) e plasma comum isento de crioprecipitado (PCIC).

Lote	Volume inicial de Plasma	Volume do plasma após adição $CaCl_2$ 0,1M	Volume final de soro AB humano	Rendimento
		PC>24h		
1	1297 mL	1362 mL	1313 mL	96,4%
2	1377 mL	1440 mL	1393 mL	96,7%
3	1343 mL	1405 mL	1365 mL	97,2%
		PCIC		
4	1151 mL	1204 mL	1164 mL	96,7%
5	1297 mL	1357 mL	1304 mL	96,1%
6	1267 mL	1325 mL	1275 mL	96,2%

O rendimento médio da produção do soro AB humano foi de 96,5%, valor superior ao obtido no processo de produção do lisado plaquetário, 84%, a partir do pool de plaquetas com volume inicial de 6105 mL (Fekete et al., 2012), que vem sendo amplamente empregado na expansão de células CMMs em condições isentas de xenoantígenos. Foi feita uma estimativa do volume final de soro AB humano obtido a partir do plasma de 6 doadores. A mediana (amplitude) encontrada foi de 1357 (1313 – 1393) mL de soro AB humano a partir de PC> 24h e 1248 (1164 – 1304) mL de soro AB humano a partir de PCIC. Considerando que o soro AB humano foi utilizado a 10%, pode-se inferir que é possível produzir 13L de meio enriquecido com soro AB humano a partir de PC>24h e 12L de meio enriquecido com soro AB humano a partir de PCIC. Considerando o índice de produção do Hemocentro de Ribeirão Preto, estima-se que, em média, são produzidas 6.300 unidades de plasmas comum anualmente (PC>24h e PCIC), sendo, 3% de tipo sanguíneo AB. Portanto, o volume a ser destinado para uso de produção de soro humano para suplementação das células mesenquimais destinadas à terapia não impacta o envio para a indústria para produção de hemoderivados.

4.2 Controle de qualidade dos lotes de soro AB humano produzidos

Os soros produzidos foram avaliados em relação a esterilidade, nível de endotoxinas e hemoglobina livre (Tabela 2) e também foi realizada uma caracterização bioquímica completa (Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7). Os valores obtidos foram comparados com os valores presentes nas bulas de dois produtos comerciais: Fetal Bovine Serum Characterized - HyClone™ Logan, UT, EUA, lote AYF165500) e Soro AB Humano - *Human AB serum* (Corning Cellgro, Manassas, VA, EUA, lote 02001), também incluídos nas referidas tabelas.

Tabela 2 - Controle de qualidade dos lotes de soros AB humanos produzidos.

Parâmetro avaliado	**Soro PC>24h Lotes**			**Soro PCIC Lotes**			**SFB HyClone®**	**Soro AB Humano Cellgro®**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**		
Hemocultura	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Detecção de Micoplasma	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Endotoxina (EU/mL)	0,382	0,306	0,358	0,306	0,314	0,326	0,5	≤5
Hemoglobina Livre (mg/dl)	<3,92	3,92	3,92	<3,92	<3,92	<3,92	11	≤20
pH	7,72	7,85	7,70	7,67	7,92	7,68	7,15	7,0-8,6
pH (3 meses)	7,72	7,84	7,74	7,80	7,88	7,84	n.d.	n.d.
pH (6 meses)	7,83	7,98	8,18	7,93	8,09	7,89	n.d.	n.d.
pH (9 meses)	7,80	7,83	8,01	7,90	7,89	7,85	n.d.	n.d.
pH (12 meses)	7,61	7,69	7,73	7,98	7,69	7,69	n.d.	n.d.

Neg= resultado negativo; **n.d.** = não determinado.

Mesmo utilizando a técnica de obtenção do soro em sistema “aberto”, os cuidados tomados na manipulação do plasma, realizando o procedimento em capela de fluxo laminar e evitando ao máximo a exposição ao meio externo através da

utilização de sistemas de transferência entre bolsas, foram eficientes e garantiram a manutenção da esterilidade do produto final.

Um dos maiores problemas de contaminação na cultura celular é a infecção por Micoplasmas, pois os mesmos não são retidos no processo de esterilização por filtração. Esta contaminação pode causar alterações nas células, como por exemplo, mudanças nas características de replicação e crescimento celular, na composição e estrutura da membrana plasmática. Este fato implica na inutilização da linhagem celular infectada, pois tais mudanças podem interferir com as características morfológicas e fisiológicas das células (ARMSTRONG, MARIANO, LUNDIN, 2010) e comprometer a saúde dos pacientes.

A análise de endotoxina é um requisito para medicamentos parenterais, uma vez que pode induzir contaminações tóxicas, elevação da temperatura (febre), colocando em risco o paciente (RUSTICHELLI et al., 2013). Para suplementação do meio de cultivo é necessário que a endotoxina presente no soro seja inferior a 5,00 EU/mL (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Verificou-se que as dosagens de endotoxina dos lotes produzidos ficaram dentro do nível reportado na literatura (GÁLVEZ et al., 2014) e presente nos soros comerciais.

Os níveis de hemoglobina livre também ficaram abaixo do determinado nos produtos comerciais. É esperado que a dosagem de hemoglobina livre nos soros produzidos seja baixa uma vez que o soro não possui presença de hemácias e para a sua produção são selecionados plasmas límpidos (sem hemólise e sem lipemia).

As amostras (2mL) para leitura do pH foram retiradas após o congelamento dos lotes de soro produzidos. A cada três meses, até completar o prazo de doze meses de estocagem, foram retiradas novas amostras para dosagem de pH. Novamente foi observado que os valores medidos estavam dentro da faixa especificada nos produtos comerciais.

Em relação ao perfil bioquímico, para o SFB foi realizada a caracterização bioquímica com a mesma metodologia aplicada nas amostras de soro AB humano. Foi selecionado o perfil de dosagem descrito nas bulas comerciais do soro AB humano e SFB. Pode-se observar que as dosagens de glicose e cálcio obtidas dos lotes de soros produzidos apresentaram valores discrepantes quando comparados aos produtos comerciais. A dosagem de cálcio elevada se deve ao volume de $CaCl_2$ 0,1M

acrescentado ao pool de plasma no procedimento para conversão de plasma em soro. Além disso, a presença de dextrose no CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina) adicionado aos plasmas causou o aumento considerável dos níveis de glicose no soro. Os soros são obtidos de bolsas de plasmas de doadores, sendo que as bolsas de sangue são coletadas na presença de 60 a 65 mL de anticoagulante CPDA-1 para cada 450±50mL de sangue total coletado. O aumento da concentração de glicose nos lotes de soro produzidos foi responsável por um aumento de 24% na concentração de glicose no meio de cultura suplementado com o soro quando comparado ao suplementado com SFB (concentração de glicose média após suplementação com os lotes de soro produzidos: 248,5 mg/dl; concentração de glicose após suplementação com SFB: 187 mg/dl).

Após três, seis, nove e doze meses de estocagem de cada lote de soro humano foi realizado um novo perfil bioquímico, apresentado na Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7 respectivamente, para verificar a influência do tempo de estocagem na composição do soro. Pode-se observar que não houve alteração significativa das dosagens comparadas às dosagens realizada logo após a produção até o prazo de 12 meses.

O uso de Plasmas de banco de sangue favorece a qualidade do soro a ser produzido por ser um produto pré-selecionado devido a criteriosa triagem dos doadores, conforme a legislação vigente (BRASIL, Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013), diminuindo a variabilidade lote a lote dos constituintes bioquímicos. Além disso, pode-se utilizar somente “plasmas de quarentena”, ou seja, plasmas liberados após realizado uma segunda sorologia, por ocasião de uma nova doação, aumentando a segurança transfusional.

Outra vantagem do uso de plasmas de banco de sangue são os ensaios sorológicos e moleculares. Neste caso, são realizados os ensaios sorológicos para: hepatite B (HBsAg e anti-HBc); hepatite C; HIV tipo 1 e tipo 2, doença de chagas, sífilis, HTLV tipo 1 e tipo 2. Além disso, testes moleculares NAT para HIV, NAT hepatite C e recentemente realizado NAT para hepatite B. Enquanto que nos soros AB humano comerciais são realizados apenas sorologia para HIV, Hepatite B e Hepatite C.

A qualidade dos soros produzidos deve ser controlada para garantir a segurança na utilização final, em pacientes. A avaliação do controle de qualidade proposto revelou que este suplemento apresenta as características necessários para ser utilizado na produção das células destinadas à terapia celular.

Tabela 3 - Perfil bioquímico dos lotes de soro após produção.

Teste	Soro PC>24h Lotes			Soro PCIC Lotes			SFB HyClone®	Soro AB Humano Cellgro®
	1	2	3	4	5	6		
Colesterol (mg/dL)	124	147	122	123	134	165	34	133
Triglicérides (mg/dL)	86	118	64	49	116	97	71	96
Glicose (mg/dL)	448	448	424	439	463	503	106	70
Sódio (meq/L)	136,3	136,8	137,5	142,4	141,3	144,2	125	139
Proteína total (g/dL)	5,6	5,7	5,5	5,8	5,4	5,7	3,7	5,2
Ferro (µg/dL)	87	70	70	83	94	89	197	n.d.
Potássio (meq/L)	4,3	4,6	4,6	2,9	2,8	3,0	12,1	3,8
Cloro (meq/L)	80,1	81,1	81,4	80,9	81,9	78,7	98,5	91
Gama GT (U/L)	35	17	25	17	18	27	6	21
Ácido úrico (mg/dL)	5,7	4,6	5,5	4,9	4,9	4,9	2,1	5,0
AST (U/L)	19,3	14,6	17,5	17,4	12,8	16,6	63,2	6
ALT (U/L)	7,4	10,1	23,8	11,3	13,6	17,7	6,3	9
Fosfatase alcalina (U/L)	78	104	117	80	111	130	513	35
Uréia (mg/dL)	34	25	29	30	23	29	31	-
Cálcio (mg/dL)	45,2	44,1	43,5	43,8	44,3	45,4	13,1	8,9
Osmolalidade (mOsm/kg)	303	303	303	345	312	321	261	285
Fosforo (mg/dL)	10,4	10,5	10,0	10,7	10,2	10,4	10,4	1,4
Albumina (g/dL)	3,8	3,7	3,7	3,8	3,7	3,8	2,4	3,6
LDH U/L	348	305	327	507	299	278	871	500
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,12	0,08	0,09	0,14	0,08	0,11	0,07	n.d.
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,35	0,29	0,31	0,51	0,26	0,40	0,09	n.d.
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,47	0,38	0,40	0,65	0,34	0,51	0,16	<0,1
Creatinina (mg/dL)	0,93	0,84	0,93	1,00	0,92	1,02	2,70	0,9

n.d. – não determinado

Tabela 4 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 3 meses de estocagem.

Teste	Soro PC>24h Lotes			Soro PCIC Lotes			SFB HyClone®	Soro AB Humano Cellgro®
	1	2	3	4	5	6		
Colesterol (mg/dL)	127	142	124	125	134	154	34	133
Triglicérides (mg/dL)	86	111	61	46	105	95	71	96
Glicose (mg/dL)	470	448	459	462	469	456	106	70
Sódio (meq/L)	134,7	125,9	129,1	138,4	136,8	132,4	125	139
Proteína total (g/dL)	5,7	5,2	5,0	5,7	5,2	5,2	3,7	5,2
Ferro (µg/dL)	79	62	70	81	88	80	197	n.d.
Potássio (meq/L)	4,1	4,3	4,4	2,7	2,8	3,0	12,1	3,8
Cloro (meq/L)	85,3	81,2	83,7	86,3	82,7	79,9	98,5	91
Gama GT (U/L)	35	15	22	16	16	24	6	21
Ácido úrico (mg/dL)	5,8	4,1	4,9	4,9	4,3	4,7	2,1	5,0
AST (U/L)	22,0	16,5	20,0	23	15,5	14,6	63,2	6
ALT (U/L)	9,0	10,8	24,3	13	12,4	12,7	6,3	9
Fosfatase alcalina (U/L)	57	99	143	60	105	103	513	35
Uréia (mg/dL)	32	23	27	32	21	28	31	-
Cálcio (mg/dL)	51,0	36,6	37,4	36,5	37,4	41,2	13,1	8,9
Osmolalidade (mOsm/kg)	302	281	289	309	304	295	261	285
Fosforo (mg/dL)	10,2	10,3	10,0	10,0	10,4	10,0	10,4	1,4
Albumina (g/dL)	3,5	3,6	3,5	3,8	3,6	3,6	2,4	3,6
LDH U/L	295	245	313	524	282	270	871	500
Bilirrubina Direta (mg/dL)	n.d.	0,09	0,09	0,12	0,10	0,10	0,07	n.d.
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	n.d.	0,20	0,25	0,35	0,20	0,33	0,09	n.d.
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,36	0,29	0,34	0,47	0,30	0,42	0,16	<0,1
Creatinina (mg/dL)	1,05	0,80	0,88	1,10	0,90	0,90	2,70	0,9

n.d. – não determinado

Tabela 5 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 6 meses de estocagem.

Teste	Soro PC>24h Lotes			Soro PCIC Lotes			SFB HyClone®	Soro AB Humano Cellgro®
	1	2	3	4	5	6		
Colesterol (mg/dL)	131	155	131	129	143	161	34	133
Triglicérides (mg/dL)	89	122	66	50	124	95	71	96
Glicose (mg/dL)	452	477	480	464	493	468	106	70
Sódio (meq/L)	132,8	135,9	134,1	137,7	140,0	141,6	125	139
Proteína total (g/dL)	5,4	5,3	5,3	5,3	5,4	5,5	3,7	5,2
Ferro (µg/dL)	84	69	72	86	95	88	197	n.d.
Potássio (meq/L)	4,0	4,5	4,4	2,7	2,8	2,9	12,1	3,8
Cloro (meq/L)	84,8	81,9	81,7	85,3	82,7	83,1	98,5	91
Gama GT (U/L)	35	17	24	17	17	27	6	21
Ácido úrico (mg/dL)	6,0	4,7	5,7	5,0	5,0	4,9	2,1	5,0
AST (U/L)	23	17,2	18,8	24	14,8	16,2	63,2	6
ALT (U/L)	13	10,6	22,5	11	12,2	14,6	6,3	9
Fosfatase alcalina (U/L)	98	99	96	64	93	114	513	35
Uréia (mg/dL)	33	25	27	30	21	29	31	-
Cálcio (mg/dL)	47,9	39,3	39,1	48,1	39,4	47,3	13,1	8,9
Osmolalidade (mOsm/kg)	296	302	299	306	311	314	261	285
Fosforo (mg/dL)	10,5	10,7	10,1	10,3	10,2	10,3	10,4	1,4
Albumina (g/dL)	3,7	3,8	3,7	3,8	3,7	3,8	2,4	3,6
LDH U/L	336	277	319	500	297	270	871	500
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,11	0,09	0,09	0,14	0,10	0,11	0,07	n.d.
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,26	0,23	0,24	0,38	0,24	0,35	0,09	n.d.
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,37	0,31	0,33	0,52	0,34	0,46	0,16	<0,1
Creatinina (mg/dL)	0,92	0,92	0,96	0,99	0,97	1,00	2,70	0,9

n.d. – não determinado

Tabela 6 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 9 meses de estocagem.

Teste	Soro PC>24h Lotes			Soro PCIC Lotes			SFB HyClone®	Soro AB Humano Cellgro®
	1	2	3	4	5	6		
Colesterol (mg/dL)	126	143	121	124	130	166	34	133
Triglicérides (mg/dL)	90	124	67	49	116	102	71	96
Glicose (mg/dL)	465	457	471	478	477	472	106	70
Sódio (meq/L)	132	131	131	138	134	134	125	139
Proteína total (g/dL)	5,6	5,5	5,5	5,7	5,6	5,7	3,7	5,2
Ferro (µg/dL)	80	67	72	83	99	91	197	n.d.
Potássio (meq/L)	4,0	4,5	4,4	2,7	2,6	2,8	12,1	3,8
Cloro (meq/L)	83,7	84,3	85,1	84,0	86,1	86,3	98,5	91
Gama GT (U/L)	36	18	26	17	18	26	6	21
Ácido úrico (mg/dL)	5,8	4,6	5,5	4,9	5,0	5,1	2,1	5,0
AST (U/L)	22,2	17,8	21,1	23,3	16,0	19,4	63,2	6
ALT (U/L)	10,2	10,2	18,1	11,5	12,5	16,3	6,3	9
Fosfatase alcalina (U/L)	97	91	94	108	91	127	513	35
Uréia (mg/dL)	31	23	27	29	21	31	31	-
Cálcio (mg/dL)	49,2	45,8	45,8	47,4	46,3	46,1	13,1	8,9
Osmolalidade (mOsm/kg)	295	291	293	307	298	299	261	285
Fosforo (mg/dL)	9,4	9,9	11,4	10,1	9,8	10,3	10,4	1,4
Albumina (g/dL)	3,6	3,6	3,6	3,7	3,6	3,8	2,4	3,6
LDH U/L	316	256	296	488	293	268	871	500
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,10	0,08	0,07	0,13	0,08	0,11	0,07	n.d.
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,27	0,20	0,26	0,43	0,23	0,22	0,09	n.d.
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,37	0,28	0,33	0,56	0,31	0,33	0,16	<0,1
Creatinina (mg/dL)	0,97	0,91	0,99	1,05	1,00	1,03	2,70	0,9

n.d. – não determinado

Tabela 7 - Perfil bioquímico dos lotes de soro produzidos após 12 meses de estocagem.

Teste	Soro PC>24h Lotes			Soro PCIC Lotes			SFB HyClone®	Soro AB Humano Cellgro®
	1	2	3	4	5	6		
Colesterol (mg/dL)	131	149	127	102	138	158	34	133
Triglicerides (mg/dL)	87	114	64	37	112	96	71	96
Glicose (mg/dL)	470	460	468	369	482	470	106	70
Sódio (meq/L)	139,4	139,3	139,0	123,0	142,2	141,3	125	139
Proteína total (g/dL)	5,7	5,7	5,4	4,7	5,5	5,6	3,7	5,2
Ferro (µg/dL)	86	74	78	72	104	94	197	n.d.
Potássio (meq/L)	4,4	4,6	4,7	2,5	2,9	3,0	12,1	3,8
Cloro (meq/L)	84,0	85,2	85,7	68,1	86,0	85,0	98,5	91
Gama GT (U/L)	36	18	26	15	18	27	6	21
Ácido úrico (mg/dL)	5,7	4,6	5,6	4,2	4,9	4,9	2,1	5,0
AST (U/L)	22,6	15,0	17,6	18,7	12,2	14,3	63,2	6
ALT (U/L)	19,6	14,4	24,5	11,3	13,7	18,6	6,3	9
Fosfatase alcalina (U/L)	102	97	126	77	92	107	513	35
Uréia (mg/dL)	31	24	27	25	21	29	31	-
Cálcio (mg/dL)	46,7	43,4	43,7	35,1	43,2	45,4	13,1	8,9
Osmolalidade (mOsm/kg)	310	308	309	271	315	314	261	285
Fosforo (mg/dL)	10,8	11,1	10,4	9,1	10,6	10,9	10,4	1,4
Albumina (g/dL)	3,6	3,6	3,6	3,1	3,6	3,8	2,4	3,6
LDH U/L	378	297	342	415	294	281	871	500
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,13	0,11	0,10	0,13	0,11	0,12	0,07	n.d.
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,32	0,25	0,28	0,33	0,25	0,37	0,09	n.d.
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,45	0,36	0,39	0,46	0,36	0,49	0,16	<0,1
Creatinina (mg/dL)	0,98	0,89	0,97	0,83	0,95	0,99	2,70	0,9

n.d. – não determinado

4.3 Cultivo em garrafas estáticas das células mesenquimais em meio suplementado com os lotes de soro AB humanos produzidos.

Para este estudo foram utilizadas CMMs humanas derivadas do cordão umbilical (isoladas na presença de soro AB humano), e expandidas em meios de cultivo suplementados com 10% soro AB humano. Como cultivo controle, foram utilizadas estas mesmas células (isoladas na presença de SFB) suplementadas com 10% SFB.

Durante o cultivo, as células mesenquimais foram observadas por microscopia. Após plaqueamento, as células distribuíam-se igualmente pela superfície do cultivo, crescendo rapidamente. Apresentaram morfologia fibroblastoide, alongada, fusiforme e pontiaguda, com núcleo eucromático, central, grande e oval, com citoplasma abundante. Quando cultivados na presença de soro humano as CMM apresentavam tamanho menores comparado as células cultivadas com SFB (Figura 6).

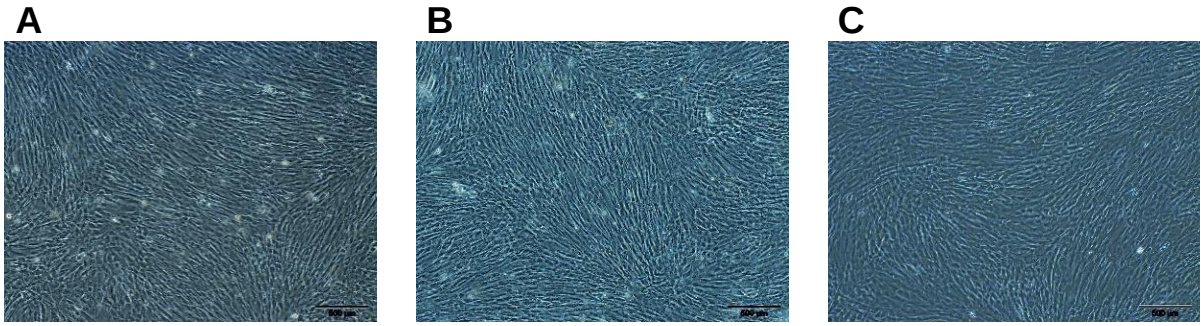


Figura 6: Fotos representativos da morfologia das células mesenquimais, na sétima passagem, cultivadas nos diferentes suplementos, PCIC (A) (n=6), PC>24h (B) (n=6) e SFB(C) (n=6) na sexta passagem.

Encontram-se apresentados nas Figuras 7 e 8 a capacidade de duplicação *(Population Doubling)* cumulativa e o tempo de duplicação das células cultivadas por quatro passagens nos lotes de soro produzidos (PC>24h e PCIC) e na condição controle suplementada com SFB (n=6) em função do tempo de estocagem. A eficácia da suplementação com soro AB humano foi avaliada após vários tempos de

estocagem pós produção (0, 3, 6, 9 e 12 meses) em função da experiência anterior do nosso grupo de pesquisa, onde foi inicialmente percebido que o tempo de estocagem influenciava de maneira negativa no comportamento da célula. Na Figura 9, é possível observar de maneira mais clara o efeito do tempo de estocagem no crescimento celular.

Em relação aos tempos de duplicação das células mesenquimais cultivadas nos meios suplementados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes suplementações utilizadas (SFB, PCIC e PC>24h) em relação as passagens e ao tempo de armazenamento (0, 3, 6, 9 e 12 meses) ($p>0,05$, Tukey-Kramer teste).

A expansão celular final encontrada em relação ao número de células iniciais nos cultivos foi de: soro PCIC 13,00 (SD 2,42)x; soro PC>24h 12,46 (SD 1,72)x e para o SFB 11,31 (SD 2,44)x. Ao final de 12 meses de estocagem dos soros AB humano produzidos a expansão final foi de: soro PCIC 15,10 (SD 0,18)x; soro PC>24h 15,06 (SD 0,04)x e para SFB 14,98 (SD0,68)x. Em geral, a média da capacidade de duplicação cumulativa foi semelhante entre as células cultivadas nos três meios de cultura suplementados ($p>0,05$, Tukey-Kramer teste).

No cultivo, observou-se a diferença no tempo necessário para as culturas atingirem a confluência, sendo aproximadamente 9 dias para os cultivos suplementados com SFB e 11 dias para o soro AB humano produzido. Também não foram observadas diferenças entre os plasmas PCIC e PC>24 horas, indicando, portanto, que ambas as fontes são eficientes. Dados da literatura relatam cinética de crescimento das CMM cultivadas com suplementos de origem humana igual ou superior aos cultivados em meio suplementados com SFB (DOUCET, ERNOU et al., 2005; BERNARDO, AVANZINI et al., 2007; SCHALLMOSER, BARTMANN et al., 2007; KOCAOEMER et al., 2007; BIEBACK, HECKER et al., 2009).

A utilização do soro humano na terapia celular é relativamente recente, o que faz com que seja necessário avaliar a viabilidade de sua produção, bem como sua qualidade e eficácia para promover o crescimento celular.

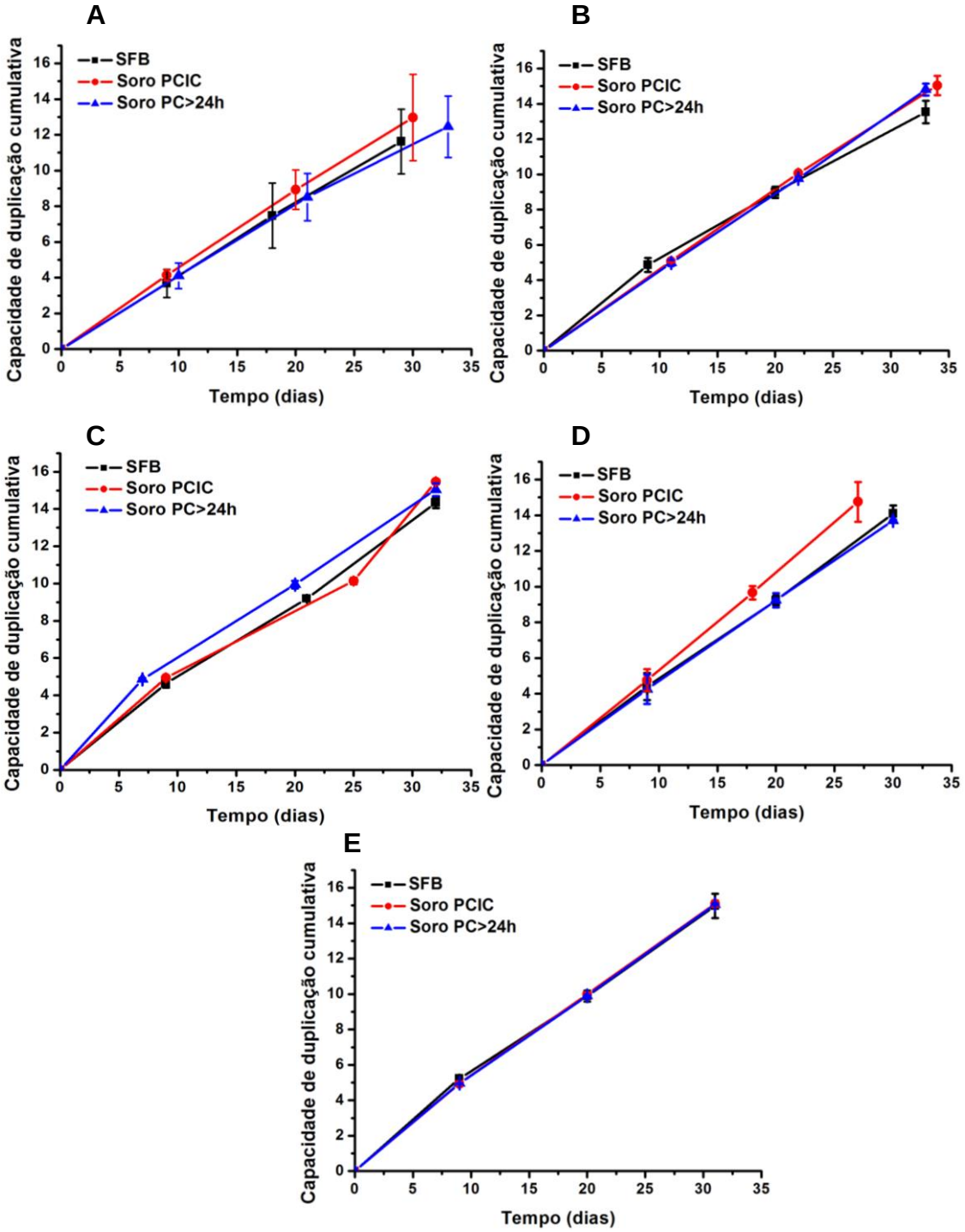


Figura 7: Cinética de expansão das células mesenquimais cultivadas nos meios suplementados com os lotes de soro AB humano produzidos no (A) primeiro mês, (B) terceiro mês, (C) sexto mês, (D) nono mês, (E) décimo segundo mês após produção e com SFB como cultivo controle. SFB = soro fetal bovino (n=6); PCIC = plasma comum isento de crio (n=6); PC>24h = plasma comum fracionado a mais de 24 horas (n=¨6).

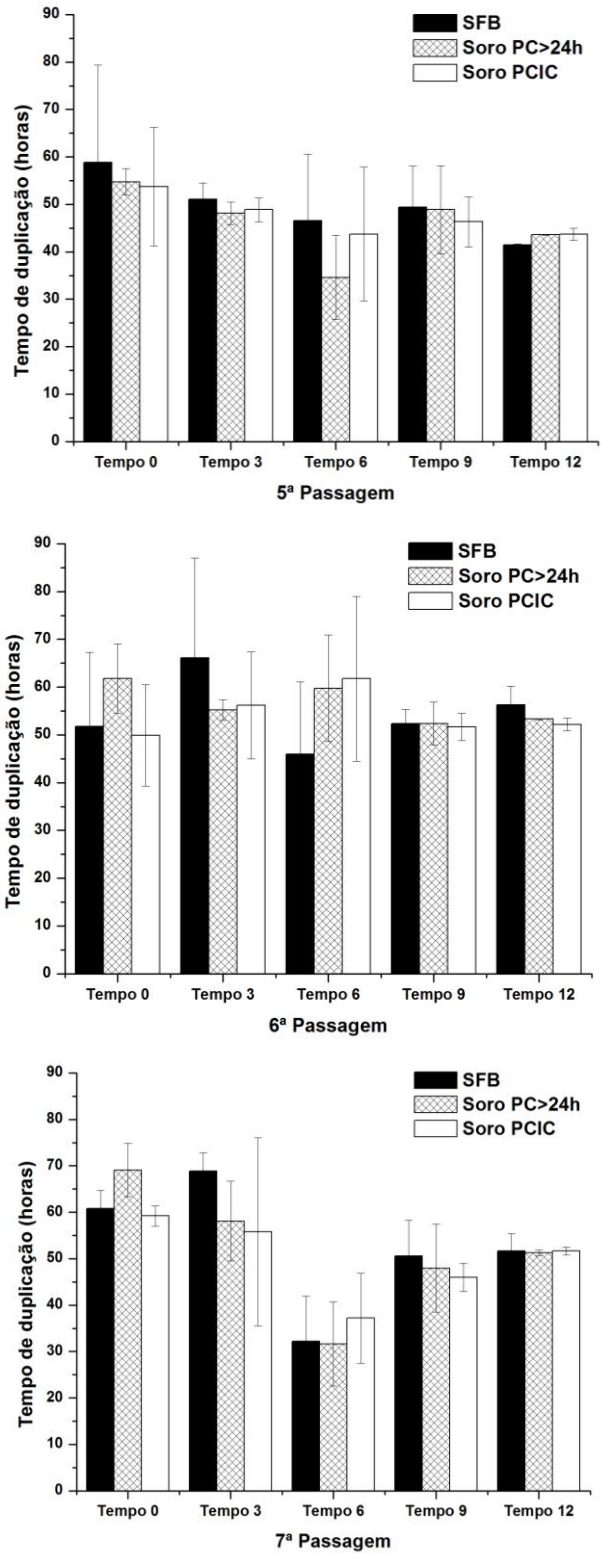


Figura 8: Tempo de duplicação das células mesenquimais cultivadas nos meios suplementados com os lotes de soro AB humano produzidos (n=12) do primeiro (tempo 0) ao décimo segundo mês (tempo 12) após produção e com SFB (n=6) como cultivo controle (p>0,05).

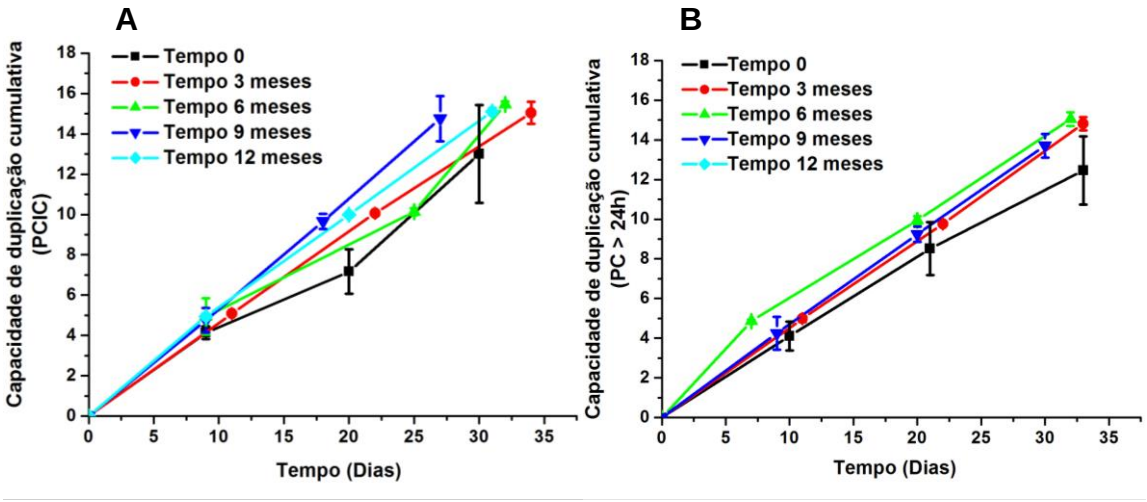


Figura 9: Avaliação da influência do tempo de estocagem do soro AB humano no crescimento das células mesenquimais (A) Plasma comum isento de crioprecipitado (n=6) e (B) Plasma comum fracionado a >24h (n=6).

Prata (2011) verificou que foi possível expandir adequadamente as CMMs em meio suplementado com SFB, soro AB humano ou LP, sem diferenças significativas entre as células cultivadas com os dois últimos suplementos. Kocaoemer e colaboradores (2007) avaliaram o cultivo de CMM de tecido adiposo em meios suplementados com soro AB humano, plasma rico em plaquetas ativadas por trombina (tPRP) e SFB, demonstrando que soro AB humano e tPRP fornecem um efeito proliferativo significativamente maior sobre a CMM do que o SFB, onde nas primeiras seis passagens o Soro humano e tPRP proporcionou uma expansão de 66,6 (SD 15,7)x e 68,1 (SD 6,7), respectivamente, em comparação com 24,4 (SD 0,7) do SFB. Vários autores têm realizado o cultivo das CMMs em Lisado plaquetário e têm indicado que este seria mais eficiente que os demais suplementos isentos de xenoantígenos (KOCAOEMER et al., 2007; FEKETE et al., 2012; LI et al., 2015; SHIH, BURNOUF, 2015). No entanto, o custo para obtenção do LP é superior ao do soro AB humano, pois são necessárias mais bolsas de transferências, equipos, soldagens do aparelho de conexão estéril e pelo menos um filtro para leucorredução de plaquetas em bancada, para cada pool de seis a dez unidades. Além disso, o estoque de plaquetas é escasso, sendo um dos hemocomponentes mais complicados no estoque do banco de sangue, pela validade do hemocomponente ser apenas de cinco dias, e o processo

de obtenção de LP é mais laborioso e demorado do que o de soro AB humano e sua utilização acarreta em um maior risco transfusional. Também deve-se considerar que, com material proveniente de 10 doadores, é possível produzir pelo menos quatro vezes mais meio de cultivo suplementado com 10% soro AB humano do que com 5% LP (17L *versus* 4L) (PRATA, 2011). É indicado o uso de soro do tipo AB para uso em cultivo de células, para evitar o risco de reação imunogênica em função dos anticorpos Anti-A e Anti-B presentes no soro humano (MOLL et al, 2014).

Outros autores também já relataram a eficácia da suplementação das células mesenquimais com soro AB humano (BERNARDO, AVANZINI et al., 2007; KOCAOEMER et al., 2007; BIEBACK, HECKER et al*.,* 2009, LINDROOS et al., 2010, ALDAHMASH et al., 2011). No entanto, em nenhum trabalho foram avaliadas diferentes fontes para obtenção deste produto e a influência do tempo de estocagem do mesmo. Neste trabalho, não foram observadas diferenças relevantes no crescimento das células suplementadas com soro recém produzido e com soro estocado por até 12 meses a ≤20ºC, indicando que a prazo de validade deste produto pode ser de no mínimo, 12 meses. O prazo de validade do SFB é de cinco anos (Fetal Bovine Serum Characterized - HyClone™, Logan, UT, EUA) e a validade do LP é de 18 meses (SHIH, BURNOUF, 2015).

Alguns estudos afirmam que o uso de soro autólogo para suplementação de meio de cultivo, proporciona uma melhor expansão das CMMs quando comparado com soro alogênico (STUTE et al, 2004; KOBAYASHI et al., 2005), porém, o volume de soro autólogo é limitado e para a aplicação clínica das células, faz necessário um volume grande desta suplementação.

Também tem sido sugerido na literatura que o soro coagulado naturalmente é mais eficaz que o plasma para uso na proliferação e expansão celular. Isto parece ser devido à libertação de determinados polipeptídeos e fatores de crescimento liberados partir das plaquetas ativadas durante o processo de coagulação (BALK et al., 1981; GOSPODAROWIC, ILL, 1980). Porém, para obtenção do soro coagulado, seria necessário um doador exclusivo para essa finalidade, não sendo aproveitado nenhum outro componente sanguíneo. Além disso, o custo necessário para processamento e exames complementares seria maior que, no caso do plasma, uma vez que no último caso os custos já se encontram incluídos no processamento de rotina do sangue.

Outra abordagem descrita na literatura envolve o cultivo das CMM em meios isentos de soro (AGATA et al, 2009; RODRIGUES, GRIFFITH, WELLS, 2010; SOLMESKY et al., 2010; MIMURA et al., 2011; CHASE et al., 2012), os quais são compostos por suplementos sintéticos, reduzindo a variabilidade lote a lote. Apesar de ser uma alternativa promissora, as CMMs não mantêm um padrão de expansão semelhante ao obtido nas células em culturas suplementadas com soro (AGATA et al, 2009; RODRIGUES, GRIFFITH, WELLS, 2010).

4.4 Cultivo das células mesenquimais utilizando soro AB humano em microcarregador e frascos *spinner*

A eficácia da suplementação com soro AB humano produzido também foi avaliado nas células mesenquimais cultivadas em condições compatíveis com a produção em larga escala, utilizando a tecnologia de microcarregadores. Esta tecnologia vem sendo considerada a mais eficaz e econômica para produzir grandes quantidades de células para uso clínico (SIMARIA et al., 2014). O grande número de CMM necessárias para aplicações clínicas (doses de até 5 milhões de CMM/Kg de peso corporal) exige um cultivo de expansão em larga escala rápido e reprodutível (RINGDEN et al., 2006). Nesta etapa do trabalho foi utilizado apenas o soro AB humano proveniente de PCIC (lote 6) com tempo de estocagem de 12 meses, uma vez que foi anteriormente observado comportamento semelhante na utilização de PCIC e PC>24h nos diferentes tempos de estocagem.

Para os cultivos em microcarregador poliestireno P102-L (Hyclone™, Logan, UT, EUA), foram utilizadas CMMs na quarta passagem com inóculo inicial de $2{,}0 \times 10^6$ cel/mL no frasco *spinner* de 250 mL contendo inicialmente 50mL de meio de cultura para aumentar a densidade celular, favorecendo a adesão. O processo de adesão é crítico e essencial para as células dependentes de ancoramento, principalmente se for submetida a cultivos agitados. Se as células não estiverem bem aderidas aos microcarregadores, podem não resistir a agitação mecânica proveniente do sistema de cultivo (YANG et al., 2007). Após 6 horas do início do experimento, adicionou-se

50 mL de meio de cultura, totalizando um volume de trabalho de 100 mL de meio de cultura suplementado com 10% SFB (n=3) e soro AB humano (n=3).

Os resultados obtidos e apresentados na Figura 10 mostraram que as células cultivadas em SFB e soro AB humano, assim como observado nas culturas estáticas, apresentaram perfil de crescimento semelhantes. No cultivo suplementado com soro AB humano houve crescimento celular até 7 dias, e o número máximo de células quantificadas foi de $3{,}13 \times 10^7$ (SD 0,57) células, e para o cultivo suplementado em SFB houve crescimento celular até 8 dias, e o número máximo de células quantificado foi de $2{,}92 \times 10^7$ (SD 0,68). Adotando como medida de eficiência do cultivo o fator de expansão celular, ou seja, a relação do número de células máximo quantificado dividido pelo número de células inoculadas no cultivo, pode-se dizer que o cultivo em Soro AB humano atingiu um fator de expansão de 15,7, enquanto que no cultivo em SFB atingiu um fator de expansão de 14,6.

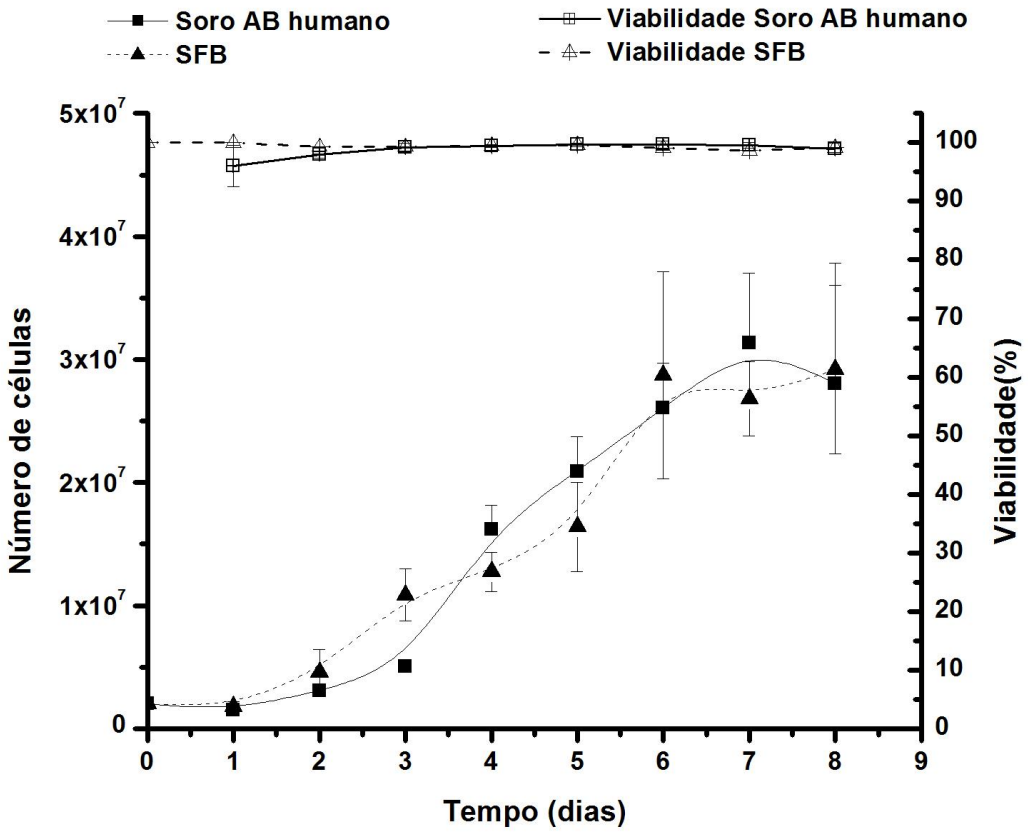


Figura 10: Crescimento das CMM cultivadas em microcarregador e frasco *spinner.* Os resultados apresentados são referentes as CMM cultivadas com suplementação de 10% plasma AB humano (n=3) e cultivadas com 10% SFB (n=3).

Recentemente, alguns autores têm expandido CMM em microcarregadores com meios isentos de soro StemPro® MSC SFM XenoFree (Gibico, Life Technologies) (DOS SANTOS et al., 2011). Dos Santos e colaboradores (2011), expandiram CMMs em frascos *spinner* com meio isento de soro, partindo de um inóculo inicial de $5x10^4$ cel/mL, obteve fator de expansão 18,0 (SD 1,0) em 14 dias de cultivo para CMM da medula óssea e fator de expansão 14,0 (SD 7,0) para CMM do tecido adiposo, enquanto que, neste trabalho em 7 dias de cultivo o fator de expansão foi de 15,7. Considerando o tempo de cultivo, a expansão em soro humano demonstrou ser mais eficiente. Tan e colaboradores (2015), demonstraram que os meios de cultura sem suplementação de soro podem não suportar o cultivo das CMMs em microcarregador em frasco agitado, pelo fato das CMMs não se aderirem bem aos microcarregadores em função da tensão de cisalhamento hidrodinâmico, diminuindo o crescimento celular.

Neste trabalho a partir de um inóculo maior de células, foi possível obter densidade celular maior do que descrito na literatura. Eibes e colaboradores (2010) obtiveram, após o cultivo de CMM humanas em meio Mesenpro RS 2%SFB em microcarregador, $4,2x10^5$ cel/mL após 8 dias, com um fator de expansão de 8,4 (SD 0,8). Já Boo e colaboradores (2011) utilizaram CMM de coelho, partindo de inóculo de $1,2x10^5$ cel/mL obtiveram $6,24x10^5$ cel/mL em 14 dias de cultivo.

Vale ressaltar que ainda não foram encontrados trabalhos na literatura reportando o crescimento de CMMs em microcarregadores e meios suplementados com soro AB humano.

A partir do terceiro dia de cultivo, trocou-se diariamente 50% do meio de cultivo para auxiliar na manutenção do pH e também para prevenir a exaustão dos nutrientes e produção de metabólitos tóxicos ao crescimento celular durante o cultivo. O pH foi monitorado diariamente e manteve-se na faixa ótima de 7,2 – 7,4 durante todo o cultivo. Realizou-se diariamente a análise do perfil de concentração de glicose e ácido láctico (Figura 11). Observou-se um consumo gradativo de glicose durante todo o experimento sendo que no cultivo com soro AB humano a concentração de glicose atingiu um valor mínimo de 3,69 (SD 0,27) mM no sétimo dia, e no cultivo com SFB valor mínimo de 2,55 (SD 0,16) mM no oitavo dia, não havendo esgotamento. Em relação à produção de ácido láctico, proveniente do consumo da glicose, atingiu-se

um valor de 6,94 (SD 0,44) mM no dia 7 para o cultivo em soro AB humano e um valor de 7,57 (SD 0,14) mM no dia 8. Na literatura, o valor de ácido láctico considerado inibitório em células-tronco mesenquimais é acima de 28,0 mM (SCHOP et al., 2008), o que não foi o observado nos cultivos realizados.

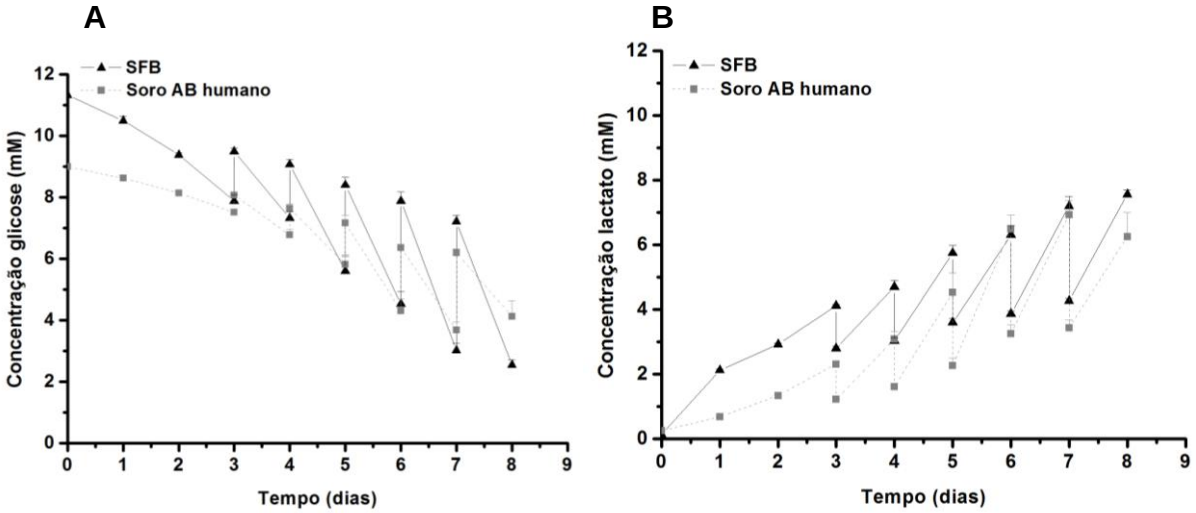


Figura 11: Concentração de glicose (A) e lactato (B) durante o cultivo realizado em microcarregador em frasco *spinner* com meio suplementado 10% Soro AB humano convertido (n=3) e 10% SFB (n=3). As linhas verticais indicam o momento onde houve troca de meio de cultura.

As distribuições das células aderidas aos microcarregadores ao longo do cultivo, nos dias 1, 4 e 7 pode ser observada na Figura 12. As células foram coradas com o reagente 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI), coloração fluorescente que evidencia os núcleos celulares, permitindo uma avaliação qualitativa de viabilidade celular, uma vez que apenas as células com integridade nuclear incorporaram o DAPI. Foi possível observar um crescimento celular gradual nos microcarregadores, e uma distribuição homogênea de células aderidas aos microcarregadores. Observou-se também a formação de aglomerados a partir do quarto dia, tornando-se de maior tamanho e densidade no sétimo dia. Esses aglomerados dificultam a recuperação celular no final do experimento.

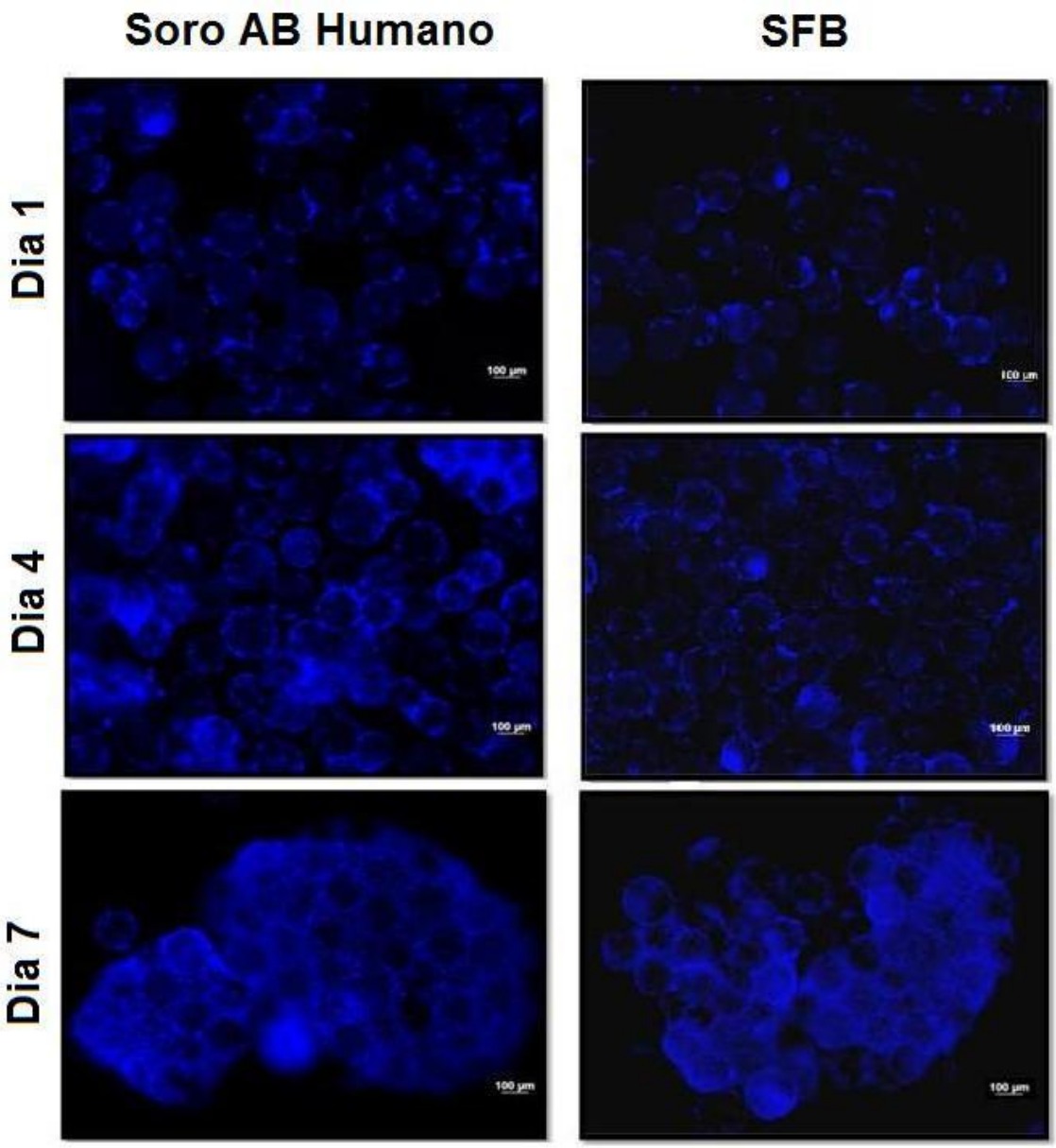


Figura 12: CMM ao longo do cultivo em microcarregador e frasco *spinner*, suplementada com Soro AB humano (n=3) e SFB (n=3), corados com reagente DAPI.

4.5 Caracterização imunofenotípica e funcional pós cultivo

Após os cultivos tanto em garrafas estáticas quanto em microcarregadores, foram avaliadas as propriedades imunofenotípica e funcionais das células.

4.5.1 Caracterização imunofenotípica

A expressão antigênica das proteínas de superfície das células mesenquimais foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados encontrados, no caso do cultivo em garrafas estáticas, demonstraram que as células cultivadas com suplementação de 10% de soro AB humano, tanto dos lotes de Soro PC>24h quanto Soro PCIC, e as células mesenquimais controle suplementadas com 10% SFB possuem características imunofenotípica compatíveis com as CMMs, isto é, expressão baixa ou ausente dos marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD14, CD45), endoteliais (CD31) e HLA-DR e expressão significativa, mas em diferentes níveis de intensidade, dos antígenos CD90, CD73, CD105, CD146, CD166 e HLA-ABC. Na Figura 13 estão representados os resultados encontrados (porcentagem de células que expressam o marcador). Não foi observada diferença entre as células cultivadas nos lotes de soro AB humanos produzidos e nas cultivadas na presença de SFB. O mesmo perfil imunofenotípico foi observado no cultivo em microcarregadores, representado na Figura 14. Também não houve diferença pré e pós nos cultivos suplementados com SFB e soro AB humano.

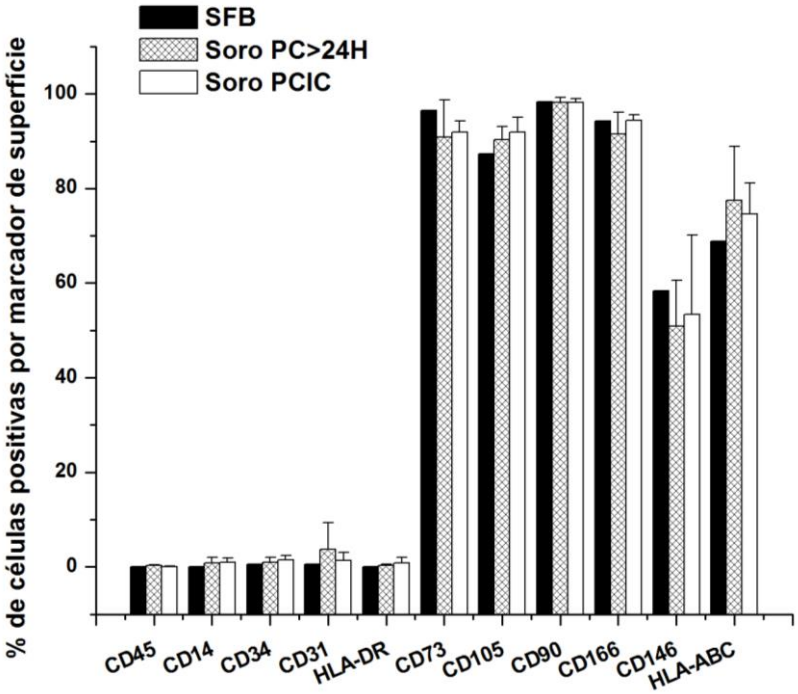


Figura 13: Principais marcadores imunofenotípicos das CMMs cultivadas em garrafas estáticas nos meios suplementados com os lotes de soro AB humano produzidos e com SFB como cultivo controle.

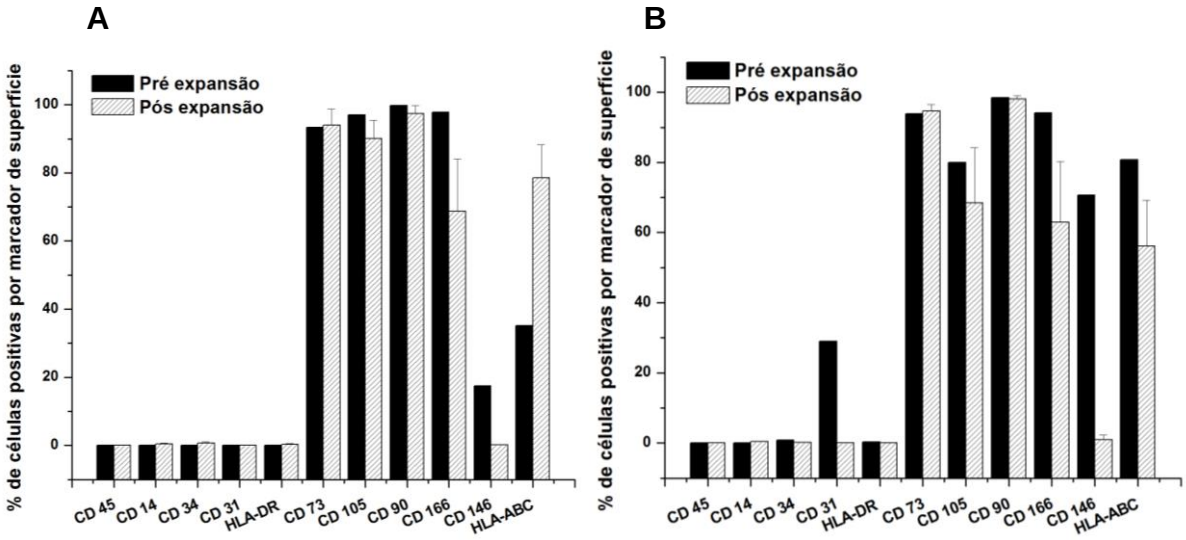


Figura 14: Principais marcadores imunofenotípicos das CMMs pré e pós cultivo em microcarregadores nos meios suplementados com os lotes de (A) soro AB humano produzidos e com (B) SFB. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio (n=3). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.5.2 Avaliação do potencial de diferenciação em adipócito e osteócito

As CMMs provenientes do cultivo em garrafa estática e em microcarregadores, foram induzidas a diferenciação em adipócitos e osteócitos Tanto as células cultivadas nos meios de cultura suplementados com os lotes de soro humano produzidos PC>24h (n=15) e PCIC (n=15) quanto as suplementadas com SFB (n=5) foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos. A diferenciação em adipócitos das CMM em garrafa estática (Figura 15) e em microcarregador (Figura 17) começou a ser evidenciada morfologicamente por volta do 13º dia após o início do cultivo em meio indutor, quando as gotículas de gordura começaram a surgir. As CMMs cultivadas em microcarregador foram induzidas a diferenciação pós cultivo (n=2), apresentaram tempo de diferenciação semelhantes as CMMs cultivadas em garrafas estáticas. A diferenciação em osteócitos das CMM em garrafa estática (Figura 16) e em microcarregador (Figura 18) começou a ser evidenciada morfologicamente por volta do 20º dia após o início do cultivo em meio indutor. O cultivo foi mantido pelo maior tempo possível, e interrompido quando as células começaram a se soltar das lamínulas. Alguns trabalhos indicam que a diferenciação de CMMs do cordão umbilical não é tão robusta quanto às células mesenquimais de medula óssea e do tecido adiposo, relatam diferença em relação ao maior tempo necessário para a diferenciação, menor frequência de células diferenciadas e menor tamanho de vacúolos lipídicos (PORTMANN-LANZ, SCHOEBERLEIN et al., 2006; ALVIANO et al., 2007; LI et al., 2007; ALAMINOS et al., 2010; ANZALONE et al., 2010). Por outro lado, Xia e colaboradores (2011) relatam que as CMM mostram um aumento na diferenciação osteogénica e uma diminuição da diferenciação adipogênica quando cultivadas em meio suplementado com LP.

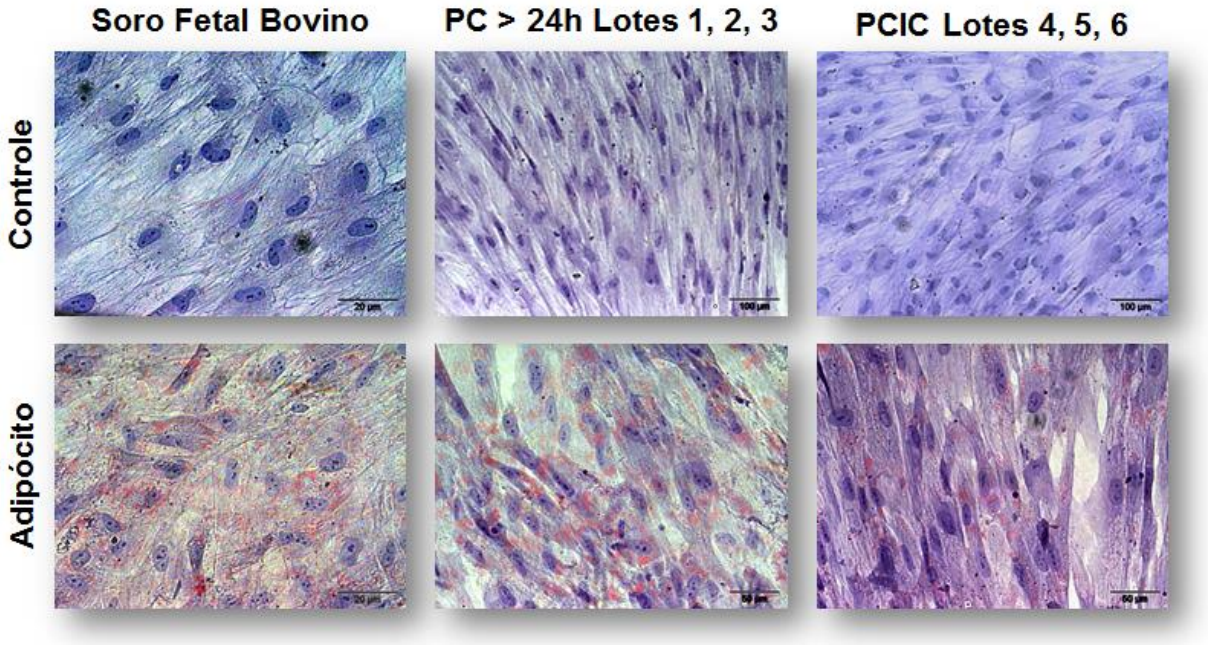


Figura 15: Imagens representativas da diferenciação de células provenientes das culturas estáticas na sétima passagem (n=35) em adipócitos com inoculo inicial de 40.000 cel/mL . Os cultivos foram mantidos a 37ºC, com troca de 50% do meio indutor a cada três dias a partir do segundo dia. As células foram coradas com Sudan II escarlate em hematoxilina de Harris.

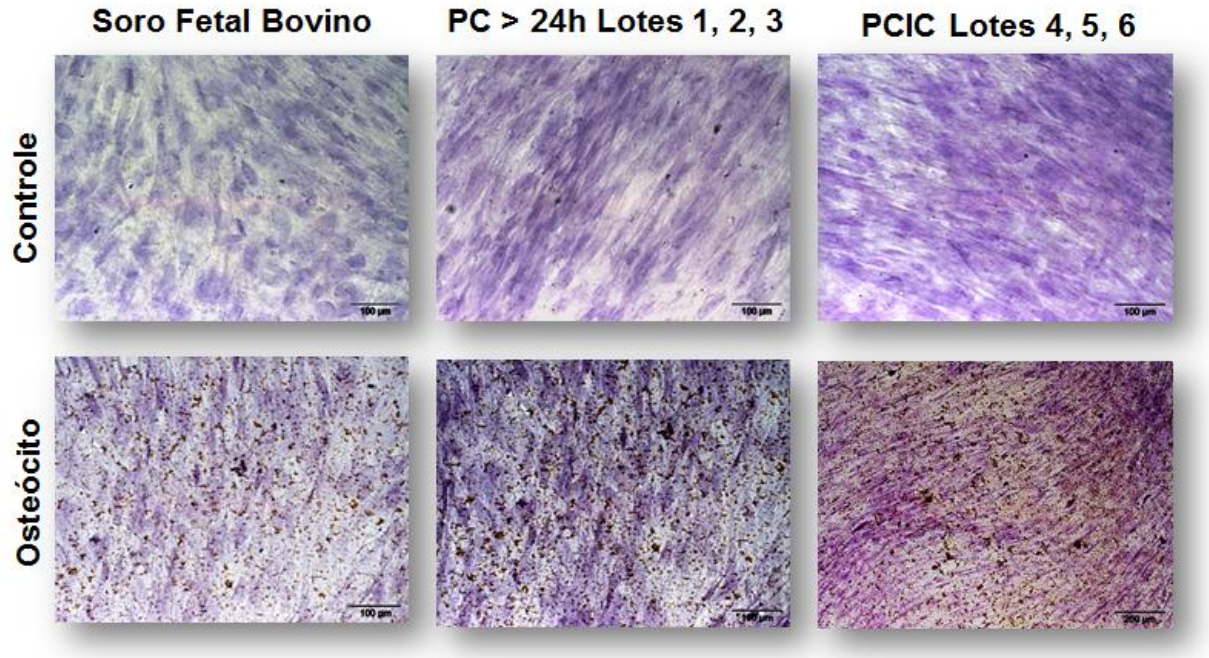


Figura 16: Imagens representativas da diferenciação de células provenientes das culturas estáticas na sétima passagem (n=35) em osteócitos com inoculo inicial de 40.000 cel/mL. Os cultivos foram mantidos a 37ºC 5%CO^2 , com troca de 50% do meio indutor a cada três dias a partir do segundo dia. As células foram coradas com Von Kossa em hematoxilina de Harris.

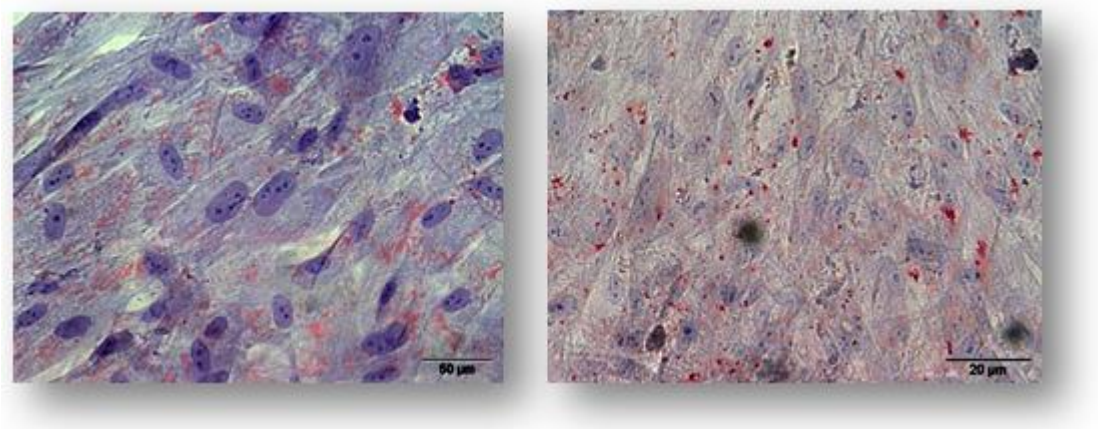


Figura 17: Imagens representativas da diferenciação de células provenientes das culturas em microcarregador e frasco *spinner* (n=2) em adipócitos com inoculo inicial de 40.000 cel/mL. Os cultivos foram mantidos a 37ºC, com troca de 50% do meio indutor a cada três dias a partir do segundo dia. As células foram coradas com Sudan II escarlate em hematoxilina de Harris.

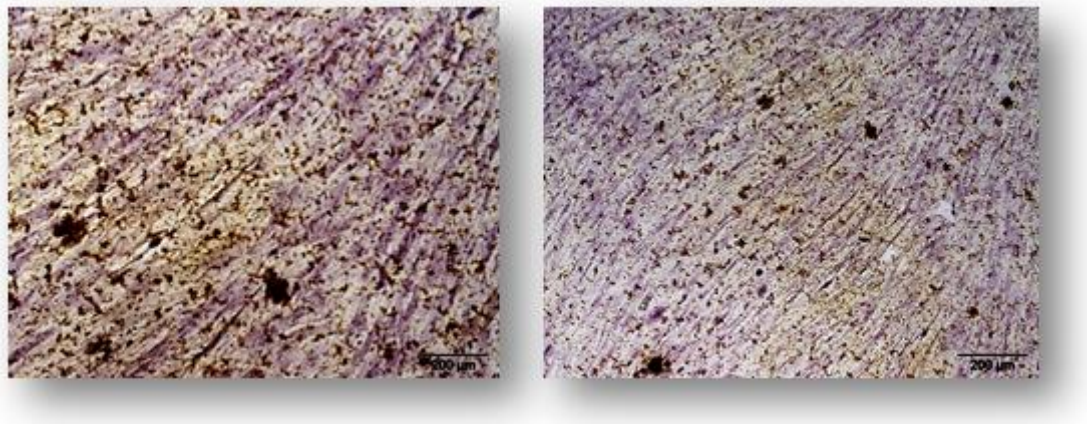


Figura 18: Imagens representativas da diferenciação de células provenientes das culturas em microcarregador e frasco *spinner* (n=2) em osteócitos. com inoculo inicial de 40.000 cel/mL. Os cultivos foram mantidos a 37ºC 5%CO^2, com troca de 50% do meio indutor a cada três dias a partir do segundo dia. As células foram coradas com Von Kossa em hematoxilina de Harris.

4.5.3 Avaliação do potencial de inibição da proliferação dos Linfócitos T

As CMMs pós cultivo em garrafa estática e em microcarregador na sétima passagem suplementado com soro AB humano no tempo de estocagem de 12 meses foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da proliferação dos linfócitos T, realizada por meio do co-cultivo destes, estimulados com PHA, com CMMs em diferentes concentrações, 1:2, 1:5 e 1:10 CMM:CMN. Os linfócitos T foram estimulados com PHA e corados com CFSE. Os resultados obtidos foram comparados com as CMMs cultivadas em meio suplementado com SFB.

As CMM pós cultivo suplementadas com Soro AB humano, em garrafa estática e microcarregador, foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos de maneira dose-dependente. O grau de inibição da proliferação de células T foi proporcional ao número de CMM:CMN na co-cultura.

A Figura 19 ilustra os resultados encontrados nas CMM cultivadas em garrafas estáticas. As CMMs cultivadas em Soro PC>24h e Soro PCIC obtiveram propriedades imunomodulatórias semelhantes, e a porcentagem média de inibição dos linfócitos T das células cultivadas em soro humano foi levemente inferior as células cultivadas com SFB ($p>0,05$, Tukey-Kramer teste). Os resultados encontrados nas CMM cultivadas em microcarregador estão ilustrados na Figura 20, sendo que as CMM cultivadas em Soro AB humano apresentaram propriedades imunomodulatórias semelhantes as cultivadas em SFB ($p>0,05$, Tukey-Kramer teste). Outros autores descreveram que as CM cultivadas em SFB foram mais eficientes do que as células cultivadas em LP na inibição da proliferação dos linfócitos (BERNARDO, AVANZINI et al., 2007). Abdelrazik e colaboradores (2011) descreve que, as CMM cultivadas com suplementação de LP, têm a expressão de algumas moléculas de superfície relevantes alteradas, levando a uma diminuição da capacidade inibidora sobre células T e a proliferação de células natural *Killer*, comparados com as células cultivadas em SFB. Não foram encontrados trabalhos relatando a capacidade de inibição da proliferação dos linfócitos de células CMMs cultivadas em soro AB humano.

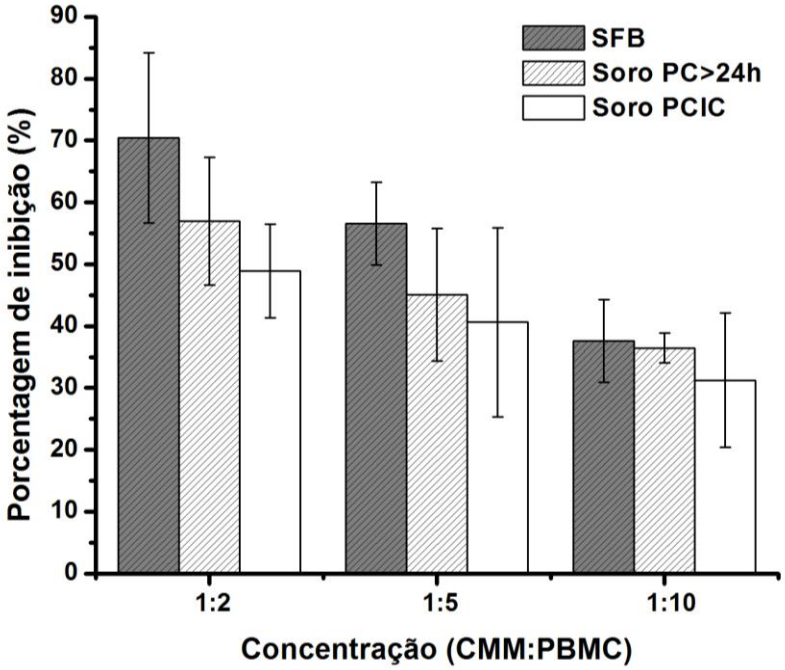
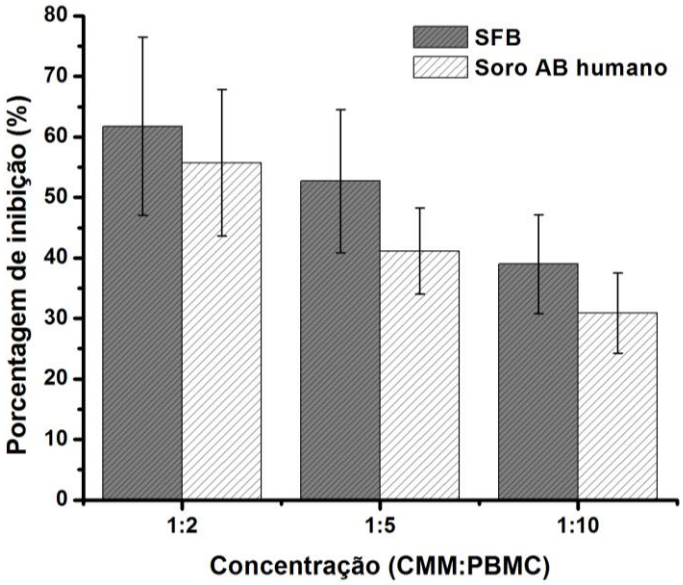


Figura 19: Inibição da proliferação dos linfócitos T (porcentagem) pelas CMMs cultivadas em garrafas estáticas nos meios suplementadas com soro AB humano PC>24h (n=3), PCIC (n=3), e SFB (n=2).



.

Figura 20: Inibição da proliferação dos linfócitos T (porcentagem) pelas CMMs pós cultivo em microcarregador e frasco *spinner* nos meios suplementadas com soro AB humano (n=1) e SFB (n=1).

4.5.4 *Análise citogenética*

A análise citogenética foi realizada em um total de 6 amostras pós cultivo em garrafa estática com meio suplementado com os diferentes lotes de soro AB humano com 12 meses de estocagem, e 1 amostra pós cultivo em frasco *spinner* em meio suplementado com soro AB humano com 12 meses de estocagem.

Figura 21: Cariótipo da CMM pós cultivo em meio suplementado com soro AB humano convertido na sétima passagem em garrafa estática e frasco *spinner*.

A análise de 20 metáfases de cada amostra apresentou ausência de anomalias cromossômicas clonais, como demonstrado na Figura 21. Mesmo após 12 meses de estocagem do soro AB humano, as CMMs cultivadas não sofreram nenhuma alteração cromossômica, que poderia comprometer a saúde do paciente quando infundidas, outros autores também obtiveram cariótipo normal após cultivo em pool de soro alogênico (PAULA et al., 2015) e lisado plaquetário (KØLLE et al,, 2013).

5 CONCLUSÕES

O protocolo utilizado para a obtenção do soro AB humano convertido a partir de plasmas de doadores foi eficaz, pois permitiu a reprodutibilidade lote a lote mantendo a qualidade e esterilidade do produto final.

As duas fontes de plasma PC>24h e PCIC utilizadas para a produção do soro AB humano apresentaram características semelhantes quanto aos constituintes bioquímicos e demais parâmetros analíticos e foram eficazes na suplementação do cultivo e expansão das células mesenquimais de cordão umbilical.

A suplementação do meio com 10% de soro AB humano foi eficaz tanto no cultivo em culturas estáticas quanto em microcarregadores, pois permitiu a expansão das CMMs de maneira similar à condição controle, suplementada com 10% de SFB, com manutenção das características imunofenotípicas, funcionais e perfil citogenético pós cultivo.

De maneira geral, pode-se concluir ao longo do desenvolvimento deste trabalho que o uso do soro AB humano é viável para a substituição do SFB para cultivo de CMMs e pode ser utilizado por, no mínimo, 12 meses após a produção sem comprometimento da qualidade da célula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAZIK, H.; SPAGGIARI, G.M.; CHIOSSONE, L.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. *Eur J Immunol*., v. 41, p. 3281–3290, 2011.

AGATA, H.; WATANABE, N.; ISHII, Y. et al. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 382: p. 353–358, 2009.

ALAMINOS, M.; PEREZ-KOHLER, B. et al. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*, v. 223, n.3, p. 640-647, 2010.

ALDAHMASH, A.; HAACK-SORENSEN, M.; AL-NBAHEEN, M. et al. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Rev*, v. 7, p. 860–868, 2011.

ALVIANO, F.; FOSSATI, V. et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotente Mesenchymal Stem Cells whit the ability to differentiate into endotelial cells in vitro*. BMC Dev. Biol*, v.7, p.11, 2007.

AMABLE, P.R.; TEIXEIRA, M.V.T.; CARIAS, R.B.V.; et al. Mesenchymal Stromal Cell Proliferation, Gene Expression and Protein Production in Human Platelet-Rich PlasmaSupplemented Media. *PlosOne*, v.4, n.8, p.1-9, 2014.

ANZALONE, R.; LO IACONO et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cell Dev*, v.19, n.4, p. 423-438, 2010.

ARMSTRONG, S.E.; MARIANO, J.A.; LUNDIN, D.J.; The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*, v.38, n.2, p. 211–213, 2010.

BALK, S.D.; LEVINE, S.P.; YOUNG, L.L. et al*.* Mitogenic factors present in serum but not in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 78, p. 5656-5660, 1981.

BERNARDO, M.E.; AVANZINI, M.A.; PEROTTI, C. et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*, v.211, n.1, p. 121-30, 2007.

BIEBACK, K. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. *Transfus Med Hemother*, v.40, n.5, p. 326–335, 2013.

BIEBACK, K.; HECKER, A.; KOCAOMER, A. et al. Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow. *Stem Cells*, v.27, p. 2331–2341, 2009.

BIEBACK, K.; KINZEBACH, S. et al., Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells. Stem Cells Int, v. 2010, p. 193519, 2011.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Portaria nº 2.712, de 12 de novembro de 2013. Lex: Diário Oficial da União nº 221, 13 de novembro de 2013, Seção 1, p.106.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELL, L.M.F. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 31(Supl. 1):p. 25-35, 2009.

BUX, J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang*, v.89, n.1, p.1-10, 2005.

CÁNOVAS, D.; BIRD, N. Human AB serum as an alternative to fetal bovine serum for endothelial and cancer cell culture, *Altex,* v.4, n.29, p. 426-8, 2012.

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

CHEN, L.B.; JIANG, X.B.; YANG, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol,* v.10, p. 3016 - 3020, 2004.

CHASE, L.G.; YANG, S.; ZACHAR, V. et al. Development and characterization of a clinically compliant xeno-free culture medium in good manufacturing practice for human multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*, v.1, p. 750–758, 2012.

COLTER, D.C.; CLASS, R. et al. Rapid expansion of recycling stem cells in culture os plastic adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad. Sci,* v.97, n.7, p. 3213-3218, 2000.

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

DOS SANTOS, F.; ANDRADE, P.Z.; ABECASIS, M.M. et al*.* Toward a Clinical-Grade Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Human Sources: A Microcarrier-Based Culture System Under Xeno-Free Conditions. *Tissue Engeneeing*, v.17, n. 12, p. 1201-1210, 2011.

DOUCET, C.; ERNOU, I.; ZHANG, Y. et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of Cellular Physiology*, v. 205, n. 2, p. 228–236, 2005.

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

ERICES, A.; CONGET, P. et al. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Hematol*, v.109, n.1, p.235-242, 2000.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Microbiological Control of Celular Products, Maisonneuve SA. Section 2.6.27, 7ª edição, Sainte Ruffine, França, 2008.

FEKETE, N.; GADELORGE, M.; FURST, D. et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*, v. 14, n. 5, p. 540–554, 2012.

FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique*. 5 ed. New York: Jhon Whiney & Sons, 2005.

FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA A.J.; KULAGINA, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol, v. 4, n. 5, p. 267-274, 1976.

FUKUCHI, Y., NAKAJIMA, H. et al., Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. Stem Cell, v.22, n.5, p. 649-658, 2004.

GÁLVEZ, P.; CLARES, B.; BERMEJO, M. et al. Standard Requirement of a Microbiological Quality Control Program for the Manufacture of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Use. *Stem Cells and Development*, v. 23, n. 10, p. 1074–1083, 2014.

GOSPODAROWICZ, D.; ILL, C.R. Do plasma and serum have different abilities to promote cell growth? *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.77, 2726-2730, 1980.

HALME, D.G.; KESSLER, D.A. FDA regulation of stem-cell-based therapies. *The New England Journal of Medicine*, v.355, p. 1730–1735, 2006.

HAYNESWORTH, S.E.; GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*. Bone*, v.12, p.81-88, 1992.

HU, J.; YU, X.; WANG, Z. et al. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocrine J*, v.60, n.3, p. 347–357, 2013.

IGURA, K.; ZHANG, X. TAKAHASHI, K. et al. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytoterapy*, v.6, n.6, p. 543-553, 2004.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, v.64, p.295.hem, 1997.

JULAVIJITPHONG, S.; WICHITWIENGRAT, S.; TIRAWANCHAI, N. et al. A xeno-free culture method that enhances Wharton's jelly mesenchymal stromal cell culture efficiency over traditional animal serume supplemented cultures. *Cytotherapy*, v.16, p. 683-691, 2014.

JUNG, S.; PANCHALINGAM, K.M.; WUERTH, R.D. et al. Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 59, n.2, p. 106–120, 2012.

KOBAYASHI, T.; WATANABE, H.; YANAGAWA, T. et al. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum, *J Bone Joint Surg Br*. v.87, n.10, p. 1426-1433, 2005.

KOCAOEMER, A.; KERN, S.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Human AB serum and thrombin- activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*, v. 25, p.1270–1278, 2007.

KØLLE, S.T.; OLIVERI, R.S.; GLOVINSKI, P.V. et al. Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum - investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy*, v. 15, p.1086–1097, 2013.

LE BLANC, K.; FRASSONI, F.; BALL, L. et al*.* Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroidresistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, v. 371, p. 1579-1586, 2008.

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

LEE, O.K.; KUO, T.K. et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood, v.103, n.5, p. 1669-1675, 2004.

LEE, W.Y.; PARK, K.J.; CHO, Y.B. et al*.* Autologous adipose tissue-derived stem cells treatment demonstrated favourable and sustainable therapeutic effect for Crohn's fistula. *Stem Cells,* v. 31, p. 2575–2581, 2013.

LI, C.; WU, X.; TONG, J. et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 6, n. 55, p. 1-13, 2015.

LI, D.; WANG, G.Y. et al. Biological characteristics of human placental mesenchymal stem cells and their proliferative response to various cytokines. *Cells Tissues Organs*, v.186, n.3, p.169-179, 2007.

LINDROOS, B.; AHO, K.; KUOKKANEN, H. et al. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Eng Part,* v.16, p. 2281–2294, 2010.

MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; MURPHY, J.M. et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*, v. 4, p. 415-428, 1998.

MACKENSEN, A.; DRAGER, R.; SCHLESIER, M. et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol*, v. 49, n.3, p. 152–156, 2000.

MCELREAVERY, K.D.; IRVINE, A.I. et al. Isolation culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans*, v.19, n.1, p. 29S, 1991.

MIMURA, S.; KIMURA, N.; HIRATA, M. et al. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*, v. 55, p. 181–187. 2011.

MITCHELL, K.E.; WEISS, M.L. et al., Matrix cell from Wharton's jelly from neurons and glia. *Stem Cells*, v.21, n.1, p.50-60, 2003.

MOLL, G.; HULT, A.; BAHR, L.V. et al. Do ABO Blood Group Antigens Hamper the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stromal Cells? *Plos One*, v. 9, n.13, p. 1-11, 2014.

MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. 1ed, São Paulo Roca, 2007.

ORLIC, D; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, v. 98, p. 10344-10349, 2001.

PAULA, A.C.C.; MARTINS, T.M.M.; ZONARI, A. et al. Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance c-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation. *Research & Therapy*, v. 6 n.76, p.1-19, 2015.

PHERMTHAI, T.; ODGLUN, Y.; CHUENWATTANA, P. et al. Successful derivation and characteristics of xeno-free mesenchymal stem cell lines from human amniotic fluid generated under allogenic cord blood serum supplementation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine,* v. 8, p. 216 – 223, 2011.

PHINNEY, D.G.; ISAKOVA, I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des,* v. 11, p. 1255–1265, 2005.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair. *Stem Cells*, v. 25, p. 2896-2902, 2007.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, n.5411, p. 143-147.

PORTMANN-LANZ, C.B.; SCHOEBERLEIN, A. et al. Placental mesenchymal stem cell as potential autologous graft for pre- and perinatal neurogneration. *Am J Obstet Gynecol*, v. 194, n. 3, p. 664-673, Mar, 2006.

POPOVSKY, M.A.; MOORE, S.B. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, v.25, n.6, p.573-577, 1985.

PRATA, K.L. Análise comparativa das células mesenquimais obtidas de diferentes tecidos dos anexos fetais. Ribeirão Preto: [s.n.], 164 p., 2011.

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

PYTLÍK, R.; STEHLITÍK, D.; SOUKUP, T. et al., The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, p. 3415–3427, 2009.

RINGDEN, O.; UZUNEL, M.; RASMUSSON, I., et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease.*Transplantation*, v.81, p.1390, 2006.

RODRIGUES. M.; GRIFFITH, L.G.; WELLS, A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther*, v. 1 n. 32, 2010.

RUSTICHELLI, D.; CASTIGLIA, S.; GUNETTI, M. et al., Validation of analytical methods in compliance with good manufacturing practice: a practical approach. *Journal of Translational Medicine,* v. 11, n. 197, p. 1-13, 2013.

SACHS, U.J.; KAUSCHAT, D.; BEIN, G. White blood cell-reactive antibodies are undetectable in solvent/detergent plasma. *Transfusion*, v.45, n.10, p.1628-1631, 2005.

SALVADÈ, A.; DELLA MINA, P. et al., Characterization of platelat lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatament of bone defects. *Tissue Eng Part C Methods*, v.16, n.2, p.201-214, 2010.

SCHALLMOSER, K.; BARTMANN, C. et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. v.47, n.8, p.1436-1446, 2007.

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

SHAILER, C., AND CORRIN, K. Serum supply: policies and controls operating in New Zealand. *Dev. Biol. Stand*, v. 99, p. 71-77, 1999.

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

SHIH, D.T.; BURNOUF, T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New Biotechnology*, v. 32, n. 1, 2015.

SIMARIA, A.S.; HASSAN, S.; VARADARAJU, H. et al., Allogeneic Cell Therapy Bioprocess Economics and Optimization: Single-Use Cell Expansion Technologies, *Biotechnol Bioeng*, v. 111, n. 1, p. 69–83, 2014.

SOLMESKY, L.; LEFLER, S.; JACOB-HIRSCH, J. et al. Serum free cultured bone marrow mesenchymal stem cells as a platform to characterize the effects of specific molecules. *PLoS One*, v. 5, e12689, 2010.

STUTE, N.; HOLTZ, K.; BUBENHEIM, M. et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol,* v. 32, p. 1212–1225, 2004.

SUN, L.Y.; HSIEH, D.K.; SYU, W.S. et al., Cell proliferations of human bone marrow mesenchymal stem cells on bridegradable microcarriers enchances in vitro differentiation poencial. *Cell Proliferation*, v.43, p.445-456, 2010.

SUNDIN, M.; RINGDEN, O.; SUNDBERG, B. *et al*. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. v. 92, n. 9, p. 1208–1215, 2007.

TAN KY, TEO KL, LIM JF, et al., Serum-free media formulations are cell line especific and require optimization for microcarrier culture, *Cytotherapy*. v. 17, p. 1152-1165, 2015.

TEKKATTE, C.; GUNASINGH, G.P.; CHERIAN, K.M.; SANKARANARAYANAN, K. Humanized Stem Cell Culture Techniques: The Animal Serum Controversy. *Stem Cells International*, p. 1-14; 2011.

VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R. et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol. in Vitro,* v. 18, p. 1-12, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION*.* Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organization*, v.75, n. 6, p. 505–513, 1997.

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

YANG, Z.; ZHANG, F.; MA, W.; CHEN, B.; ZHOU, F. et al. A novel approach to transplanting bone marrow ste.m cells to repair human myocardial infarction: delivery via a noninfarct-relative artery. *Cardiovasc Ther,* v. 28, p. 380–385, 2010.

XIA, W.; LI, H.; WANG, Z. et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*., v.35, p. 639–643, 2011.

ZHAO, R.L.; DUAN, W.M.; REYES, M. et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol,* v. 174, p. 114, 2002.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. 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 – Cinética de expansão celular no decorrer do cultivo em garrafas estáticas.

Tabela A1 – Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no primeiro mês após produção e com SFB como cultivo controle (dados referentes à Figura 7A).

	Meio	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
P5	10% SFB	3	3,68	0,78	3,93
	10% PCIC	3	4,14	0,31	4,04
	10% PC>24h	3	4,11	0,72	3,77
P6	10% SFB	3	7,47	1,82	7,97
	10% PCIC	3	7,17	1,10	9,20
	10% PC>24h	3	8,51	1,33	8,36
P7	10% SFB	3	11,31	2,44	11,20
	10% PCIC	3	13,00	2,42	13,00
	10% PC>24h	3	12,46	1,72	11,58

P = passagem, SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela A2 – Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no terceiro mês após produção e com SFB como cultivo controle (dados referentes à Figura 7B).

	Meio	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
P5	10% SFB	3	4,86	0,39	4,90
	10% PCIC	3	5,08	0,07	5,04
	10% PC>24h	3	4,98	0,17	5,00
P6	10% SFB	3	8,98	0,32	8,87
	10% PCIC	3	10,06	0,13	10,13
	10% PC>24h	3	9,76	0,11	9,83
P7	10% SFB	3	13,54	0,64	13,57
	10% PCIC	3	15,04	0,54	15,27
	10% PC>24h	3	14,81	0,33	14,60

P = passagem, SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela A3 – Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no sexto mês após produção e com SFB como cultivo controle (dados referentes à Figura 7C).

	Meio	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
P5	10% SFB	3	4,63	0,21	4,56
	10% PCIC	3	4,94	0,09	4,94
	10% PC>24h	3	4,86	0,07	4,82
P6	10% SFB	3	9,19	0,10	9,18
	10% PCIC	3	10,14	0,18	10,14
	10% PC>24h	3	9,94	0,21	10,06
P7	10% SFB	3	14,34	0,30	14,40
	10% PCIC	3	15,46	0,14	15,48
	10% PC>24h	3	15,04	0,34	15,06

P = passagem, SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela A4 – Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no nono mês após produção e com SFB como cultivo controle (dados referentes à Figura 7D).

	Meio	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
P5	10% SFB	3	4,41	0,76	4,79
	10% PCIC	3	4,76	0,61	5,04
	10% PC>24h	3	4,25	0,83	3,91
P6	10% SFB	3	9,23	0,27	9,22
	10% PCIC	3	9,66	0,38	9,47
	10% PC>24h	3	9,24	0,39	9,07
P7	10% SFB	3	14,09	0,47	14,04
	10% PCIC	3	14,75	1,12	14,73
	10% PC>24h	3	13,70	0,60	13,80

P = passagem, SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela A5 – Capacidade de duplicação das células nos meios suplementados com PCIC e PC>24h no décimo segundo mês após produção e com SFB como cultivo controle (dados referentes à Figura 7E).

	Meio	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
P5	10% SFB	3	5,22	0,02	5,22
	10% PCIC	3	4,94	0,15	4,87
	10% PC>24h	3	4,96	0,01	4,96
P6	10% SFB	3	9,89	0,31	9,89
	10% PCIC	3	9,99	0,12	10,06
	10% PC>24h	3	9,91	0,03	9,91
P7	10% SFB	3	14,98	0,68	14,98
	10% PCIC	3	15,10	0,18	15,04
	10% PC>24h	3	15,06	0,04	15,04

P = passagem, SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela A6 - Tempo de duplicação celular obtido nos diferentes suplementos e tempos de estocagem na quinta passagem (dados referentes à Figura 8).

Tempo estoque	Meio	N	Média	Desvio Padrão
Tempo 0	SFB 10%	6	58,83	20,58
	Soro PCIC 10%	6	53,72	12,52
	Soro PC> 24h 10%	6	54,75	2,80
3 meses	SFB 10%	6	51,10	3,44
	Soro PCIC 10%	6	48,86	2,51
	Soro PC> 24h 10%	6	48,09	2,36
6 meses	SFB 10%	6	46,59	13,97
	Soro PCIC 10%	6	43,74	14,07
	Soro PC> 24h 10%	6	34,58	8,91
9 meses	SFB 10%	6	49,43	8,57
	Soro PCIC 10%	6	46,33	5,25
	Soro PC> 24h 10%	6	48,87	9,27
12 meses	SFB 10%	6	41,40	0,19
	Soro PCIC 10%	6	43,68	1,27
	Soro PC> 24h 10%	6	43,57	0,09

SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela A7 - Tempo de duplicação celular obtido nos diferentes suplementos e tempos de estocagem na sexta passagem (dados referentes à Figura 8).

Tempo estoque	Meio	N	Média	Desvio Padrão
0	SFB 10%	6	51,77	15,48
	Soro PCIC 10%	6	49,87	10,61
	Soro PC> 24h 10%	6	61,78	7,28
3 meses	SFB 10%	6	66,13	20,94
	Soro PCIC 10%	6	56,17	11,18
	Soro PC> 24h 10%	6	55,15	2,16
6 meses	SFB 10%	6	45,95	15,13
	Soro PCIC 10%	6	61,74	17,28
	Soro PC> 24h 10%	6	59,75	11,18
9 meses	SFB 10%	6	52,31	2,97
	Soro PCIC 10%	6	51,64	2,84
	Soro PC> 24h 10%	6	52,37	4,45
12 meses	SFB 10%	6	56,25	3,98
	Soro PCIC 10%	6	52,19	1,29
	Soro PC> 24h 10%	6	53,32	0,14

P = passagem, SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela A8 - Tempo de duplicação celular obtido nos diferentes suplementos e tempos de estocagem na sétima passagem (dados referentes à Figura 8).

Tempo estoque	Meio	N	Média	Desvio Padrão
0	SFB 10%	6	60,76	3,94
	Soro PCIC 10%	6	59,21	2,21
	Soro PC> 24h 10%	6	69,08	5,75
3 meses	SFB 10%	6	68,85	3,95
	Soro PCIC 10%	6	55,80	20,22
	Soro PC> 24h 10%	6	58,06	8,59
6 meses	SFB 10%	6	32,17	9,78
	Soro PCIC 10%	6	37,20	9,69
	Soro PC> 24h 10%	6	31,64	9,11
9 meses	SFB 10%	6	50,54	7,74
	Soro PCIC 10%	6	45,93	3,06
	Soro PC> 24h 10%	6	47,97	9,50
12 meses	SFB 10%	6	51,66	3,78
	Soro PCIC 10%	6	51,66	0,91
	Soro PC> 24h 10%	6	51,25	0,60

P = passagem, SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

APÊNDICE B - Expansão celular em microcarregador e frasco *spinner*.

Tabela B1 - Crescimento celular em frasco *spinner* de acordo com o meio utilizado (dados referentes à Figura 10).

Dias	**10% Soro AB Humano (n=3)**	**10% SFB (n=3)**
1	$1,50 \times 10^6$ ($\pm 3,46 \times 10^5$)	$1,80 \times 10^6$ ($\pm 4,00 \times 10^5$)
2	$3,07 \times 10^6$ ($\pm 1,26 \times 10^6$)	$4,60 \times 10^6$ ($\pm 1,84 \times 10^6$)
3	$5,03 \times 10^6$ ($\pm 4,16 \times 10^5$)	$1,09 \times 10^7$ ($\pm 2,10 \times 10^6$)
4	$1,62 \times 10^7$ ($\pm 2,03 \times 10^6$)	$1,27 \times 10^7$ ($\pm 1,62 \times 10^6$)
5	$2,09 \times 10^7$ ($\pm 2,82 \times 10^6$)	$1,64 \times 10^7$ ($\pm 3,62 \times 10^6$)
6	$2,60 \times 10^7$ ($\pm 3,66 \times 10^6$)	$2,87 \times 10^7$ ($\pm 8,43 \times 10^6$)
7	$3,13 \times 10^7$ ($\pm 5,69 \times 10^6$)	$2,68 \times 10^7$ ($\pm 3,02 \times 10^6$)
8	$2,80 \times 10^7$ ($\pm 9,81 \times 10^6$)	$2,92 \times 10^7$ ($\pm 6,84 \times 10^6$)

SFB = Soro Fetal Bovino

Tabela B2 - Concentração de glicose no frasco *spinner* (mM) de acordo com o meio utilizado (dados referentes à Figura 11A).

Dias	10% Soro AB Humano (n=3)	10% SFB (n=3)
0	9,00 (0,00)	11,33 (0,00)
1	8,63 (±0,08)	10,50 (±0,15)
2	8,15 (±0,03)	9,39 (±0,06)
3	7,52 (±0,06)	7,89 (±0,20)
3	8,07 (±0,03)	9,50 (±0,10)
4	6,78 (±0,19)	7,33 (±0,20)
4	7,65 (±0,13)	9,07 (±0,17)
5	5,82 (±0,33)	5,60 (±0,49)
5	7,17 (±0,25)	8,41 (±0,25)
6	4,31 (±0,38)	4,53 (±0,40)
6	6,37 (±0,06)	7,89 (±0,29)
7	3,69 (±0,27)	3,03 (±0,23)
7	6,20 (±0,12)	7,22 (±0,20)
8	4,13 (±0,52)	2,55 (±0,16)

SFB = Soro Fetal Bovino

Tabela B3 -Concentração de lactato frasco *spinner* (mM) de acordo com o meio utilizado (dados referentes à Figura 11B).

Dias	10% Soro AB Humano (n=3)	10% SFB (n=3)
0	0,26 (0,00)	1,66 (0,00)
1	0,68 (±0,01)	2,13 (±0,03)
2	1,34 (±0,01)	2,93 (±0,04)
3	2,31 (±0,09)	4,12 (±0,04)
3	1,22 (±0,02)	2,80 (±0,06)
4	3,09 (±0,24)	4,71 (±0,21)
4	1,61 (±0,11)	3,04 (±0,09)
5	4,53 (±0,60)	5,75 (±0,23)
5	2,27 (±0,23)	3,60 (±0,12)
6	6,49 (±0,44)	6,31 (±0,29)
6	3,25 (±0,28)	3,87 (±0,09)
7	6,94 (±0,44)	7,20 (±0,30)
7	3,44 (±0,25)	4,27 (±0,07)
8	6,26 (±0,75)	7,57 (±0,14)

SFB = Soro Fetal Bovino

APÊNDICE C – Caracterização imunofenotípica das células mesenquimais.

Tabela C1 – Caracterização imunofenotípica das células cultivadas em garrafas estáticas de acordo com o meio utilizado (dados referentes à Figura 13).

N=36	SFB	Soro PC>24h	Soro PCIC
CD45	0,10	0,24 (±0,25)	0,05 (±0,07)
CD14	0,00	0,78 (±1,26)	0,90 (±0,94)
CD34	0,61	0,98 (±1,05)	1,48 (±0,93)
CD31	0,50	3,71 (±5,66)	1,36 (±1,7)
HLA-DR	0,00	0,24 (±0,33)	0,86 (±1,09)
CD73	96,54	90,89 (±7,78)	91,93 (±2,38)
CD105	87,35	90,28 (±2,83)	91,95 (±3,06)
CD90	98,27	98,23 (±1,06)	98,17 (±0,82)
CD166	94,30	91,49 (±4,65)	94,44 (±1,07)
CD146	58,32	50,85 (±9,67)	53,41 (±16,73)
HLA-ABC	68,87	77,43 (±11,43)	74,56 (±6,66)

SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela C2 – Caracterização imunofenotípica das células cultivadas em microcarregador de acordo com o meio utilizado (dados referentes à Figura 14).

N = 8	SFB pré *Spinner*	SFB 10%	Soro AB Humano pré *Spinner*	Soro AB Humano
CD 45	0,00	0,00 (0,00)	0,00	0,02 (±0,02)
CD 14	0,00	0,37 (±0,26)	0,00	0,45 (±0,20)
CD 34	0,87	0,15 (±0,1)	0,07	0,75 (±0,29)
CD 31	29,00	0,04 (±0,02)	0,00	0,02 (±0,04)
HLA-DR	0,34	0,07 (±0,13)	0,08	0,31 (±0,21)
CD 73	93,89	94,69 (±1,74)	93,35	94,05 (±4,72)
CD 105	79,92	68,46 (±15,66)	97,02	90,10 (±5,38)
CD 90	98,40	98,05 (±0,95)	99,73	97,41 (±2,36)
CD 166	94,07	62,93 (±17,31)	97,77	68,76 (±15,22)
CD 146	70,65	0,92 (±1,32)	17,43	0,12 (±0,08)
HLA-ABC	80,73	56,19 (±13,01)	35,17	78,58 (±9,71)

SFB = Soro Fetal Bovino.

APÊNDICE D – Inibição da proliferação dos linfócitos T.

Tabela D1 – Inibição da proliferação dos linfócitos T (porcentagem pelas CMMs cutivadas em garrafas estáticas de acordo com o meio suplementado (dados referentes à Figura 19).

	10% SFB	**10% Soro PCIC**	**10% Soro PC>24h**
Proporção 1:2	70,42 (±13,79)	48,87 (±7,57)	56,99 (±10,32)
Proporção 1:5	56,57 (±6,65)	40,61 (±15,28)	45,08 (±10,67)
Proporção 1:10	37,64 (±6,69)	31,26 (±10,85)	36,47 (±2,42)

SFB = Soro Fetal Bovino, PCIC = Plasma Comum Isento de Crioprecipitado, PC>24h = Plasma Comum fracionado a mais de 24 horas.

Tabela D2 – Inibição da proliferação dos linfócitos T (porcentagem pelas CMMs cutivadas em microcarregador de acordo com o meio suplementado (dados referentes à Figura 20).

	10% Soro AB Humano	**10% SFB**
Proporção 1:2	55,74 (±12,09)	61,77 (±14,75)
Proporção 1:5	41,13 (±7,11)	52,69 (±11,83)
Proporção 1:10	30,86 (±6,63)	38,98 (±8,16)

SFB = Soro Fetal Bovino.