UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

VINÍCIUS AUGUSTO SIMÃO

Estabelecimento de um bioprocesso para proliferação de células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano em biorreator

Ribeirão Preto 2020

VINÍCIUS AUGUSTO SIMÃO

Estabelecimento de um bioprocesso para proliferação de células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano em biorreator

Versão corrigida

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

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes Co-orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

> Ribeirão Preto 2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou de pesquisa, desde que citada a fonte.

Simão, Vinícius Augusto

Estabelecimento de um bioprocesso para proliferação de células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano em biorreator. Ribeirão Preto, 2020.

149 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Ribeiro Paes, João Tadeu.

1. Células estromais mesenquimais. 2. Tecido adiposo humano. 3. Biorreator. 4. Frasco *spinner.* 5. Genotoxicidade.

DEDICATÓRIA

Não haveria esperança no mundo sem a ciência. Para países com um ralo desenvolvimento social, ela é ainda mais importante. No entanto, em épocas de desgoverno, não se admira que a ciência brasileira esteja sendo tão desvalorizada, desacreditada e abandonada.

Sendo assim, desenvolver pesquisa no Brasil é mais do que driblar a carência de recursos, os desvios de corrupção e o preconceito, é acreditar que os momentos ruins serão apenas um período da história e que a ciência, por mais rasteiras que possa tomar, não desistirá de cumprir seu papel com a sociedade.

Dessa forma, é com orgulho que dedico esta tese à ciência brasileira, reduto da 'balbúrdia' dos 'parasitas'.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a colaboração inicial de meu Orientador Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes que me concedeu a oportunidade de realizar o doutorado no Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel) e ao meu Co-orientador Prof. Dr. Aldo Tonso por toda ajuda e orientação quanto aos aspectos da cultura em larga escala com biorreator, além disso, sou muito agradecido pelo empréstimo de equipamentos necessários para a execução dos experimentos, tais como os frascos spinners e a mesa agitadora, e pela disponibilidade do Laboratório de Biotecnologia Viral do Instituto Butantan da USP para execução da análise metabólica sob os cuidados do técnico J. Leme.

Também agradeço pela contribuição:

Prof. Dr. Pedro H. B. Aoki e Dr. Carlos J. L. Constantino com a parceria para execução da análise espectroscópica do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

Drª Roseli N. S. Antunes e Josianne T. Fukasawa pela formidável análise de imunofenotipagem no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da FAMEMA.

Aos companheiros de laboratório que me ajudaram na execução dos primeiros experimentos, Heloisa Brand, Caetano P. E. Ribeiro e Lougan L. Pereira e aos demais do grupo GenTe Cel que de alguma forma contribuíram no decorrer das discussões científicas e organizações para manutenção do bom ambiente de trabalho.

A minha fiel companheira nas viagens para Ribeirão Preto e participação nas disciplinas ao longo do cumprimento dos créditos do doutorado, Laís F. Marques.

Aos funcionários da UNESP que me auxiliaram com a manutenção dos insumos do laboratório, utilização de equipamentos e pequenos reparos, Giba, Eliana, Adriano e Allan, meu muito obrigado. Assim como a secretária Susie, do Departamento de Genética da FMRP-USP, que através de sua dedicação possibilitou minha matrícula a tempo no programa, além de sempre disponível para tirar as dúvidas de um mero pós-graduando.

Agradecimentos especiais as Doutoras presentes em minha banca de qualificação (Drª Josiane L. Schiavinato, Profª Drª Kamilla Swiech e Profª Drª Maristela D. Orellana) por todo conhecimento passado em um momento tão crucial de minha formação e a Drª Amanda Mizukami pela disponibilidade em conferir meu primeiro treinamento com biorreator e os primeiros microcarregadores, a vocês minha eterna gratidão.

Também imprescindível é o agradecimento aos fundos de apoio à pesquisa científica que auxiliaram este projeto, tais como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) — Código de Financiamento oo1, pela importante concessão da bolsa de doutorado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), processo #2014/03324-4 pelo auxílio pesquisa que possibilitou a importação do biorreator assim como a aquisição de inúmeros insumos deste projeto.

Por fim, não menos importantes são as pessoas as quais agradeço por toda companhia ao longo desse trajeto de 48 meses para obtenção do título de Doutor. Primeiramente aos meus pais e irmãs, agradeço por todo apoio, orgulho e confiança neste período. Aos meus amigos, pelos momentos extrovertidos que me ajudaram a distrair a cabeça dos problemas corriqueiros típicos de qualquer pós-graduação, e a minha companheira de todas as horas, Rafaela Choi, por todo apoio até quando eu não merecia, pela confiança que sempre depositava em mim e que me trazia pra cima, e claro por toda ajuda no entendimento e execução da técnica do ensaio cometa.

A todos o meu maior e mais sincero obrigado! Vocês são parte dessa conquista.

"Não é a força do gotejar da água que fura a pedra, mas sim a persistência incansável desta ação."

- Ivan Teorilang

RESUMO

SIMÃO, V. A. Estabelecimento de um bioprocesso para proliferação de células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano em biorreator. 2020. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O emprego das células estromais mesenguimais multipotentes de tecido adiposo humano (CEM-TAh) tem sido considerado uma alternativa terapêutica promissora em diversos estudos pré-clínicos e clínicos devido a sua facilidade de obtenção e a baixa imunogenicidade, podendo ser empregadas em transplantes alogênicos. No entanto, anteriormente ao uso clínico, a proliferação celular extensiva resulta em envelhecimento que afeta a capacidade terapêutica e sua segurança para uso no organismo. Em função destes aspectos, busca-se com este projeto a proposição de uma metodologia para proliferação de CEM-TAh em biorreator tipo tanque agitado, visando estabelecer um sistema de proliferação robusto que concilie a eficiência no rendimento celular com um menor prejuízo à qualidade genética do cultivo. Para isso foram conduzidos experimentos em cultura estática com frascos-T de 25 cm², e de suspensão em menor (frasco spinner de 125 mL) ou larga escala (biorreator de 1 L). Os resultados demonstraram a ausência (p>0,05) de influência do volume de meio de cultura (5, 10 ou 15 mL) sobre o rendimento do cultivo celular em cultura estática. No desenvolvimento de um protocolo de cultivo em frasco spinner os resultados definiram a concentração celular inicial de 30:1 (2.4 x 10⁴ células/mL), regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, meio de cultura com 10% de SFB e renovação de 50% a cada 72 h, microcarregador gelatinoso macroporoso Cultispher-S em 1 g/L e velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa. A seguir foi otimizado o cultivo em larga escala em biorreator através de uma avaliação gradual de cada variável do bioprocesso. Ficou definido a concentração celular inicial de 15:1 (1,2 x 10⁴ células/mL), regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, meio de cultura com 10% de SFB e renovação de 25% a cada 48 h, velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa, pH 7,3, microcarregador gelatinoso macroporoso Cultispher-S em 1 g/L e concentração de oxigênio dissolvido de 20 a 40% (ajustes c/ 72 h). Os cultivos em biorreator também foram avaliados quanto a sua integridade genômica através do ensaio cometa que demonstrou fragmentação progressiva do DNA das células em função do tempo em proliferação e do teste do micronúcleo de valor similar à situação controle do início do cultivo. O trabalho demonstra que a manipulação de algumas variáveis aperfeiçoa e melhora o rendimento celular de CEM-TAh em culturas de suspensão e que as avaliações da integridade genômica do cultivo devem se tornar corriqueiras para atestar confiabilidade e qualidade às células proliferadas em larga escala para utilização em terapia celular.

Palavras-chave: Células estromais mesenquimais; Tecido adiposo humano; Biorreator; Bioprocesso; Frasco spinner; Genotoxicidade.

ABSTRACT

SIMÃO, V. A. Establishment of a bioprocess for the proliferation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells in a bioreactor. 2020. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The use of multipotent mesenchymal stromal cells of human adipose tissue (ASC) has been considered a promising therapeutic alternative in several preclinical and clinical studies due to its ease of obtaining and low immunogenicity, and can be used in allogeneic transplants. However, prior to clinical use, extensive cell proliferation results in aging that affects the therapeutic capacity and its safety for use in the organism. Due to these aspects, this project seeks to propose a methodology for the proliferation of ASCs in agitated tank-type bioreactors, aiming to establish a robust proliferation system that reconciles efficiency in cell yield with less damage to the genetic guality of the cultivation. For this, experiments were carried out in static culture with 25 cm² T-flasks and on a small (125 mL spinner flask) or large scale culture suspension (1 L bioreactor). Results demonstrated the no-influence (p>0.05) of the volume of culture medium (5, 10 or 15 mL) on the cell yield in static culture. In the development of a spinner flask cultivation protocol, the results defined the initial cell concentration of 30:1 (2.4 x 10^4 cells/mL), intermittent cell adhesion regimen at 70 rpm, 10% FBS and 50% renewal every 72 h of the culture medium, macroporous gelatinous microcarrier Cultispher-S at 1 g/L and agitation rate of 50 rpm in the proliferative phase. Next, large-scale cultivation in a bioreactor was optimized through a gradual assessment of each bioprocess variable. The initial cell concentration was 15:1 (1.2 x 10^4 cells/mL), intermittent cell adhesion regimen at 70 rpm, 10% FBS and 25% renewal every 48 h, 50 rpm agitation in the proliferative phase, pH 7.3, macroporous gelatinous microcarrier Cultispher-S at 1 g/L and dissolved oxygen concentration of 20 to 40% (adjustments every 72 h). Cultures in a bioreactor were also evaluated for their genomic integrity through the comet assay that demonstrated progressive DNA fragmentation of the cells as a function of the proliferating time and the micronucleus test of similar value to the control situation of the beginning of the culture. The work demonstrates that the manipulation of some variables improves the ASCs yield in suspension cultures, and that the evaluations of the genomic integrity of the culture must become commonplace to certify the reliability and quality of the large scale proliferated cells for use in cell therapy.

keywords: Mesenchymal stromal/stem cells; Human adipose tissue; Bioreactor; Bioprocess; Spinner flask; Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 5 – Modelo de frasco *spinner* utilizado. São observados os dois braços laterais de inoculação/amostragem e o eixo impelidor central formado pela barra de vidro com altura ajustável pela parte externa da tampa, e a parte interna contendo o suporte plástico que realiza a rotação pela presença de uma barra magnética.......51

Figura 19 – Perfil de crescimento das CEM-TAh dado pelo fator de proliferação ao longo de cada dia de cultivo para os experimentos B₁, B₂ e B₃ em biorreator........87

Figura 22 – Viabilidade das CEM-TAh pré (0 h) e pós-cultivo (504 h) em biorreator nos experimentos B_1 , B_2 e B_3 . Viabilidade dada pela absorbância das amostras

Figura 24 – *Scores* do ensaio cometa das CEM-TAh obtidas do inóculo inicial (C-) e as 72, 144, 216, 288, 360, 432 e 504 h de cultura em biorreator (B₁, B₂ e B₃). Os danos ao DNA se correlacionaram (p<0,05) com o tempo das células em cultivo....93

Figura 25 - Diferenciação das CEM-TAh dos cultivos B₁ (C-D), B₂ (E-F) e B₃ (G-H) após 504 h de cultura em biorreator. Um exemplo de Controle para a diferenciação adipogênica (A) e osteogênica (B) das células pós-cultivo de cada situação em biorreator é apresentado. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela presença de vacúolos lipídicos no citoplasma das células coradas em vermelho com Oil Red O (C, E e G, setas pretas). A diferenciação osteogênica foi observada pela coloração da matriz celular calcificada em vermelho com o uso de Alizarin Red S (D, F e H, setas brancas). Barras: 50 μm (C, E, G e H), 100 μm (A, B e F), 200 μm (D)......94

Figura 33 – Frequência de CEM-TAh micronucleadas após submissão ao teste do micronúcleo com amostras do inóculo inicial (C-) e após as 216 h do cultivo B_4 ou B_5 em biorreator. Para ambas as culturas também foram realizadas o controle positivo (C+) com o tratamento das células com agente genotóxico mitomicina C......104

Figura 34 – Índice de Divisão Nuclear das CEM-TAh após submissão ao teste do micronúcleo com amostras do inóculo inicial (C-) e após as 216 h do cultivo B_4 ou B_5 em biorreator. Para ambas as culturas também foram realizadas o controle positivo (C+) com o tratamento das células com agente genotóxico mitomicina C......105

APÊNDICE

Fig. 2. Cell growth profile of the 5 (A), 10 (D) and 15 mL (G) groups, linear regression In [cells/cm2] versus the culture time of the 5 (B), 10 (E) and 15 mL (H), and log linear regression for μ max (h–1) in the culture volumes of 5 (C), 10 (F) and 15 mL (I). By the linear regression, the μ max parameters were obtained with the doubling times (td)=81.5 (5 mL), td=83.5 h (10 mL) and td=70.0 h (15 mL) for each group......141

Fig. 4. Representative flow cytometry graphs of the pool of ASC resulting from experiments with different culture medium volumes after 192 h of cultivation and cultivated in the second passage. The analysis shows that reactivity was positive for the surface markers CD73, CD90 and CD105 (> 95% of total cells) and negative for

Fig. 5. Differentiation of the pool of ASC submitted to the experiments with different culture medium volumes in T-flasks after 192 h of cultivation and cultivated in the second passage. Control for adipogenic (A), osteogenic (D) and chondrogenic (G) differentiations were used. Adipogenic differentiation was confirmed through the presence of lipid vacuoles in the cytoplasm of the cells, indicated by red coloration with Oil Red O (B and C, arrow). Differentiation in osteocytes was verified by staining the orange-red cell matrix with the use of Alizarin Red S (E and F, arrow) and chondrogenic differentiation was confirmed by Alcian Blue staining, where blue indicates the synthesis of proteoglycans by chondrocytes (H and I, arrow). Absence in A, D and G of morphological alterations of ASC or positive reactions that indicate the presence of the differentiation products after staining with the specific dyes proves the differentiation potential of the cultured ASC and only after the stimulus provided by the environment of the differentiation medium. Bars 100 μ m (A, D, E, G, and H), 50 μ m (F and I) and 25 μ m (B and C). Magnification of 100× (A, D, E, G, and H), 200x (F and I) and 400x (B and C).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Terapias alogênicas com o uso de diferentes fontes e quantidades/doses necessárias de CEM
Tabela 2 – Atributos dos principais biorreatores para cultivo em suspensão deCEM
Tabela 3 – Levantamento literário de estudos realizados com CEM-TAh em culturade suspensão tipo tanque agitado
Tabela 4 – Especificações técnicas do microcarregador Cultispher-S
Tabela 5 – Resumo dos experimentos conduzidos em duplicata em frascospinner
Tabela 6 – Apresentação dos parâmetros fixos e variáveis avaliados em cadaexperimento único conduzido no biorreator
Tabela 7 – Descrição dos experimentos S1 a S4 em frasco spinner68
Tabela 8 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aosMC durante as 24 h de cultivo em diferentes regimes de agitação e velocidade nosexperimentos S_1 a S_4 em frasco <i>spinner</i>
Tabela 10 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aos MC durante as 24 h de cultivo em diferentes concentrações de inóculo inicial nos experimentos S_1 , S_5 e S_6 em frasco <i>spinner</i>
Tabela 11 – Descrição dos experimentos S5, S7 e S8 em frasco spinner
Tabela 12 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aosMCdurante as 24 h de cultivo em diferentes concentrações de SFB nosexperimentos S_5 , S_7 e S_8 em frasco <i>spinner</i>
Tabela 13 – Descrição dos experimentos S9 e S10 em frasco spinner74
Tabela 14 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos S9 eS10 em frasco spinner

Tabela 15 – Descrição dos experimentos $S_9 e S_{11} a S_{14} em frasco spinner$
Tabela 16 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos S_9 , S_{11} , S_{12} , S_{13} e S_{14} em frasco <i>spinner</i>
Tabela 17 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos S15 eS16 em frasco spinner
Tabela 18 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos B1, B2 eB3 em biorreator
Tabela 19 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos $B_4 e B_5$ em biorreator
APÊNDICE

Table 1. Assignments of the main vibration bands of the FT-IR spectra recorded for
the culture medium of ASCs142
Table 2. Biochemical (mM) determination of nutrients and metabolites presents in the different volumes of culture medium throughout ASCs culture

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Antibiótico-Antimicótico.

Am: Amostragem.

ANOVA: Análise de Variância.

ASC(s): Adipose-derived mesenchymal stromal cells (em inglês).

ATP: Adenosina Trifosfato.

B₁: Experimento em biorreator com inóculo inicial de 60:1, 20% de OD e 70 rpm de velocidade de agitação.

B₂: Experimento em biorreator com inóculo inicial de 30:1, 2% de OD e 70 rpm de velocidade de agitação.

B₃: Experimento em biorreator com inóculo inicial de 30:1, 20% de OD e 50 rpm de velocidade de agitação.

B₄: Experimento em biorreator com inóculo inicial de 15:1, 20 a 40% de OD, 50 rpm de velocidade de agitação e 25% de renovação do meio de cultura a cada 72 h.

B₅: Experimento em biorreator com inóculo inicial de 15:1, 20 a 40% de OD, 50 rpm de velocidade de agitação e 25% de renovação do meio de cultura a cada 48 h.

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética.

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CEM: Células Estromais Mesenquimais Multipotentes.

CEM-CUh: Células Estromais Mesenquimais derivadas de Cordão Umbilical humano.

CEM-MOh: Células Estromais Mesenquimais derivadas de Medula Óssea humana.

CEM-PLh: Células Estromais Mesenquimais derivadas de Placenta humana.

CEM-SM: Células Estromais Mesenquimais derivadas de Sangue Menstrual humano.

CEM-TAh: Célula Estromal Mesenquimal multipotente derivada de Tecido Adiposo humano.

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa.

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

CT: Células-Tronco.

CTA: Células-Tronco Adultas.

CTE: Células-Tronco Embrionárias.

CTM: Célula-Tronco Mesenquimal.

DAT: Derivado de Tecido Adiposo.

DMSO: Dimetilsufóxido.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

DSBs: Double Strand Breaks (em inglês).

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético.

Et al: Et alii (em latim).

EUA: Estados Unidos da América.

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

FT-IR: Absorção do Infravermelho com Transformada de Fourier.

hECM: Human Extracellular Matrix (em inglês).

HLA: Histocompatibility Antigens (em inglês).

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina-1.

In: Inoculação.

ISCT: International Society for Cellular Therapy (em inglês).

LA/BE: Laranja de Acridina (3,6-dimetillaminoacridina) combinada com Brometo de

Etídeo (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio).

LIF: Fator inibidor da leucemia.

LMP: Low Melting Point (em inglês).

MC: Microcarregadores.

MHC-I: Complexo-I de histocompatibilidade.

MHC-II: Complexo-II de histocompatibilidade.

MN: Micronúcleo.

MO: Medula Óssea.

MSC: Mesenchymal Stromal/Stem Cells (em inglês).

NMP: Normal Melting Point (em inglês).

OD: Oxigênio dissolvido.

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development (em inglês).

PBS: Tampão Fosfato Salino.

PIBIC: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica.

ROS: Reactive Oxygen Species (em inglês).

RPM: Rotações Por Minuto.

S₁: Experimento em frasco *spinner* com agitação Intermitente a 70 rpm na fase de inoculação.

S₂: Experimento em frasco *spinner* com agitação Intermitente a 100 rpm na fase de inoculação.

S₃: Experimento em frasco spinner com agitação contínua a 70 rpm na fase de inoculação.

S₄: Experimento em frasco spinner com agitação contínua a 100 rpm na fase de inoculação.

S₅: Experimento em frasco *spinner* com inóculo inicial de 30:1 (2,4 x 10^4 células/mL).

S₆: Experimento em frasco *spinner* com inóculo inicial de 60:1 (4,8 x 10^4 células/mL).

S₇: Experimento em frasco spinner com 0% de SFB.

 S_8 : Experimento em frasco *spinner* com 20% de SFB.

S₉: Experimento em frasco *spinner* com 50 rpm de velocidade de agitação na fase proliferativa.

S₁₀: Experimento em frasco *spinner* com 70 rpm de velocidade de agitação na fase proliferativa.

S₁₁: Experimento em frasco *spinner* ausente de renovação do meio de cultura.

S₁₂: Experimento em frasco *spinner* com 25% de renovação do meio de cultura a cada 48 h.

S₁₃: Experimento em frasco *spinner* com 50% de renovação do meio de cultura a cada 48 h.

S₁₄: Experimento em frasco *spinner* com 50% de renovação do meio de cultura a cada 72 h.

S₁₅: Experimento em frasco *spinner* com CEM-TAh do Doador A.

S₁₆: Experimento em frasco *spinner* com CEM-TAh do Doador B.

SA- β -gal: Senescência Associada a β -Galactosidase.

SFB: Soro Fetal Bovino.

SSBs: Simple Strand Breaks (em inglês).

TAh: Tecido Adiposo humano.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERM: Tissue Engineering And Regenerative Medicine (em inglês).

UNESP: Universidade do Estado de São Paulo.

USA: United States of America (em inglês).

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

αMEM: Alpha Modified Eagle Medium (em inglês).

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem.

< : Menor que.

> : Maior que.

±: Variação pra mais ou pra menos.

Ad: Número de células aderidas (Equação 5).

At: Número de células totais aderidas e não aderidas (Equação 5).

C: Celsius.

C-: Controle negativo.

C+: Controle positivo.

cm²: Centímetro quadrado.

cm³: Centímetro cúbico.

CO₂: Gás carbônico.

DAPI: Dicloridrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol.

dX/dt: Taxa de proliferação do cultivo em função do tempo (Equação 6).

Ead: Eficiência de adesão celular (%) (Equação 5).

Fd: Fator de diluição (Equação 1 e 2).

Fp: Fator de proliferação (Equação 9).

g: Grama.

h: Hora.

IDN: Índice de Divisão Nuclear (Equação 11).

KCI: Cloreto de Potássio.

L: Litro.

In: Logarítmico natural (Equação 7).

m: Minuto.

M1, M2, M3 e M4: Número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos, respectivamente (Equação 11).

mA: Miliampere.

mg: Miligrama.

mL: Mililitro.

mm: Milímetro.

mM: Milimolar.

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio.

N: Total das células dos quadrantes (Equação 1 e 2).

N: Total de células analisadas (Equação 11).

N0, N1, N2, N3 e N4: Nucleoides nas classes de dano 0, 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Equação 10).

N₂: Nitrogênio.

NaOH: Hidróxido de Sódio.

Nf: Total de células por mL ou presentes no cultivo (Equação 9).

Ni: Total de células aderidas após 24 h por mL ou presentes no cultivo (Equação 9).

nm: Nanômetro.

nM: Nanomol.

Nt: Número de células totais aderentes (Equação 4).

Nv: Número de células viáveis aderentes (Equação 4).

O₂: Oxigênio.

psi: Libra-força por polegada quadrada.

Q: Total de quadrantes (Equação 1 e 2).

t_d: Tempo de duplicação (h) (Equação 7).

UA: Unidade Arbitrária (Equação 10).

V: Volts.

V: Volume de meio de cultura dos cultivos em suspensão (Equação 3).

Vb: Viabilidade celular (%) (Equação 4).

X: Concentração de células/mL (Equação 1, 2 e 3).

Xc: Número total de células da cultura em suspensão (Equação 3).

X_i: Concentração celular inicial (Equação 8).

X_{max}: Concentração celular máxima (Equação 8).

α: alpha.

 $\Delta t_{ti} \rightarrow tmax$: intervalo de tempo do cultivo necessário para atingir o X_{max} (Equação 8).

µg: Micrograma.

µL: Microlitro.

µm: Micrômetro.

µ_{max}: Taxa de crescimento específica máxima.

μ_x: Taxa de crescimento específica (Equação 6).

Π: Produtividade celular máxima (células/mL/h) (Equação 8).

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Concentração de células por mL da cultura estática47
Equação 2: Concentração de células por mL aderidas ou não aos MC dos experimentos dos cultivos em suspensão com frasco spinner ou biorreator47
Equação 3: Concentração celular total do cultivo do cultivo em suspensão com frasco spinner ou biorreator
Equação 4: Viabilidade celular (%) das células aderidas ou não aos MC dos experimentos dos cultivos em suspensão com frasco spinner ou biorreator
Equação 5: Eficiência de adesão celular (%) dos experimentos da fase de inoculação em frasco <i>spinner</i> (S ₁ a S ₉)48
Equação 6: Taxa de crescimento específica57
Equação 7: Tempo de duplicação da população celular (h)57
Equação 8: Produtividade celular máxima (células/mL/h)57
Equação 9: Fator de proliferação das células aderidas em função da quantidade de células por mL ou células totais57
Equação 10: Índice de dano (score) ao DNA das células analisadas através do ensaio cometa
Equação 11: Índice de divisão nuclear das células submetidas ao teste do micronúcleo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 Aspectos gerais das células-tronco	28
1.2 Células estromais mesenquimais multipotentes	28
1.3 CEM derivadas de tecido adiposo	29
1.4 Cultura de CEM em suspensão	31
1.4.1 Biorreatores de pequena e larga escala para cultivo celular	32
1.4.2 Cultura de CEM-TAh em biorreator e frasco spinner	34
1.5 Monitoramento das condições de cultivo das CEM	38
1.6 Monitoramento da integridade e estabilidade genômica do cultivo	38
1.6.1 Ensaio cometa	40
1.6.2 Teste do micronúcleo	42
2 OBJETIVOS	44
2.1 Geral	44
2.2 Específicos	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Coleta e condicionamento do tecido adiposo	45
3.2 Isolamento e cultura das CEM-TAh	45
3.3 Tripsinização, criopreservação e descongelamento das CEM-TAh	46
3.4 Recuperação e contagem celular em câmara de Neubauer	46
3.5 Cultura das CEM-TAh em frascos-T	49
3.6 Preparação dos microcarregadores	49
3.7 Cultura das CEM-TAh em frasco spinner	51
3.8 Cultura das CEM-TAh em biorreator	53

3.9 Análise cinética da proliferação celular	57
3.10 Análise de coloração fluorescente para a densidade celular em MC	58
3.11 Análise de mensuração dos agregados de microcarregadores	58
3.12 Análise da espectroscopia do infravermelho com transformada Fourier (FT-IR)	a de 58
3.13 Análise bioquímica dos nutrientes e metabólitos	59
3.14 Análise da viabilidade celular pelo método colorimétrico	59
3.15 Análise de coloração fluorescente para a viabilidade celular em MC	60
3.16 Análise do ensaio cometa	61
3.17 Análise de detecção da β-Galactosidase nas CEM-TAh	63
3.18 Análise do micronúcleo	64
3.19 Análise imunofenotípica	65
3.20 Análise de diferenciação <i>in vitro</i>	66
3.21 Análise estatística	66
3.22 Aspectos éticos	67
4 RESULTADOS	68
4.1 Cultura das CEM-TAh em frascos-T	68
4.2 Cultura das CEM-TAh em frasco <i>spinner</i>	68
4.2.1 Fase de inoculação	68
4.2.1.1 Definição do regime e velocidade de agitação	68
4.2.1.2 Definição da concentração do inóculo inicial	70
4.2.1.3 Definição da concentração de SFB	72
4.2.2 Fase proliferativa	74
4.2.2.1 Definição da velocidade de agitação	74
4.2.2.2 Definição do regime de renovação do meio de cultura	77

4.2.2.3 Comparação do protocolo de cultivo das CEM-TAh em frasco
<i>spinner</i> entre dois doadores distintos80
4.2.2.3.1 Caracterização dos marcadores de superfície82
4.2.2.3.2 Diferenciação <i>in vitro</i> 83
4.3 Cultura das CEM-TAh em biorreator85
4.3.1 Avaliação da velocidade de agitação, da concentração do inóculo inicial e da porcentagem de oxigênio dissolvido
4.3.1.1 Evolução da densidade celular dos MC88
4.3.1.2 Mensuração dos agregados dos microcarregadores
4.3.1.3 Viabilidade das CEM-TAh pelo MTT91
4.3.1.4 Viabilidade celular das CEM-TAh aderidas aos MC91
4.3.1.5 Fragmentação do DNA das CEM-TAh pelo ensaio cometa93
4.3.1.6 Diferenciação adipogênica e osteogênica94
4.3.2 Otimização da concentração do inóculo inicial, da porcentagem de oxigênio dissolvido e do regime de renovação de meio
4.3.2.1 Evolução da densidade celular dos MC97
4.3.2.2 Mensuração dos agregados dos microcarregadores98
4.3.2.3 Viabilidade das CEM-TAh pelo MTT100
4.3.2.4 Viabilidade celular das CEM-TAh aderidas aos MC100
4.3.2.5 Fragmentação do DNA das CEM-TAh pelo ensaio cometa102
4.3.2.6 Senescência das CEM-TAh pela coloração para detecção da
β-galactosidase103
4.3.2.7 Teste do micronúcleo104
4.3.2.8 Caracterização dos marcadores de superfície105
4.3.2.9 Diferenciação <i>in vitro</i> 106

5 DISCUSSÃO	108
6 CONCLUSÕES	121
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	122
BIBLIOGRAFIA	123
APÊNDICE	138
APÊNDICE A	
ANEXOS	147
ANEXO A	147

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das células-tronco

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas que possuem a capacidade de autorrenovação por um longo período e também de se diferenciar em células maduras especializadas (NIH, 2020). Dessa forma, são capazes de reabastecer o *"pool"* de células indiferenciadas e gerar células fisiologicamente distintas de múltiplos tecidos, mantendo a homeostasia do organismo (MELTON, 2014). Há, portanto, dois aspectos que caracterizam as CT: auto-renovação e diferenciação.

As CT são classificadas em dois tipos gerais: embrionárias (CTE) ou célulastronco adultas (CTA). As CTE correspondem às células da massa celular interna do blastocisto e possuem a capacidade de se diferenciar em células e tecidos das três camadas germinativas primárias (ERIDANI, 2014; NIH, 2020). As CTA são encontradas em órgãos ou tecidos diferenciados e são responsáveis pela manutenção da integridade, reparo e remodelação tecidual (ERIDANI, 2014). As CTA, também denominadas de células-tronco somáticas, possuem a capacidade de se auto-renovar durante o ciclo de vida do organismo e gerar células filhas diferenciadas.

1.2 Células estromais mesenquimais multipotentes

As CTA isoladas de tecidos de origem mesodérmica são denominadas de células estromais mesenquimais multipotentes (CEM) (HORWITZ et al., 2005). As CEM constituem uma subpopulação de células estromais, multipotentes, não hematopoiéticas, que apresentam aspecto fibroblastóide, com núcleo eucromático, oval, grande e central, e citoplasma abundante, além disso, possuem adesão à superfície plástica quando cultivadas *in vitro* (BYDLOWSKI et al., 2009). Para ser definida como uma célula-tronco mesenquimal (CTM) as CEM deverão apresentar três condições básicas segundo a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) (DOMINICI et al., 2006): capacidade de aderência à superfície plástica; presença (≥ 95%) dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência (≤ 2) de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II, e potencial de diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos sob condições *in vitro*.

1.3 CEM derivadas de tecido adiposo

Embora a medula óssea (MO) tenha sido o primeiro órgão identificado como fonte de CEM, outros órgãos e tecidos tem sido apontados como fontes potenciais dessas células, como a pele, osso, polpa dentária, cartilagem, músculo esquelético, fígado, baço, timo, pulmão e líquido amniótico (BYDLOWSKI et al., 2009), além do cordão umbilical (ARIAS; FELMER, 2009), placenta (HEWITT et al., 2011), cérebro (TEMPLE; SHEN; GODERIE, 2011), fluido menstrual (CUENCA et al., 2018) e tecido adiposo (ZUK et al., 2001; 2002). A grande vantagem do tecido adiposo como fonte de CEM é a abundância de material disponível, pois as células podem ser obtidas do material de descarte de procedimentos como a lipoaspiração ou dermolipectomia (D'ANDREA et al., 2008), além disso, a obtenção dessas células a partir do tecido adiposo é mais rápida e menos invasiva comparada à medula óssea, ocasionando menor desconforto ao paciente, além de uma quantidade de unidades formadores de colônias 500x superior (FRASER et al., 2006). Em comparação com outras fontes, as CEM derivadas de tecido adiposo têm apresentado resultados melhores ou similares quanto à viabilidade (90-95%), expressão de marcadores de superfície e ausência de alterações morfológicas, após cinco passagens ou posterior ao processo de descongelamento (KERN et al., 2006; DARIOLLI et al., 2013).

Por estas razões, o uso de células estromais mesenquimais multipotentes derivadas de tecido adiposo humano (CEM-TAh, em inglês *ASC*) autólogas ou heterólogas apresenta-se viável como ferramenta de pesquisa e terapia celular, sendo eficaz e segura em estudos pré-clinicos e clínicos de diferentes tipos de patologias (MIZUNO; TOBITA; UYSAL, 2012; DE FRANCESCO et al., 2015; MARCELINO et al., 2015; FELIX et al., 2016; FUOCO et al., 2016; STESSUK et al., 2016; 2020). As CEM-TAh provenientes de fontes alogênicas utilizadas no tratamento de diversas doenças em receptores imunocompetentes em estudos *in vivo* não mostraram potencial antigênico, não havendo, portanto, a necessidade da utilização de imunossupressores, os transplantes não induziram reações de infecção, de rejeição e nem inflamatórias (LIN; LIN; LUE, 2012). Este fato pode se justificar pela ausência da expressão do complexo-II de histocompatibilidade (MHC-II) e pela baixa quantidade do MHC-I nas CEM-TAh e a secreção de fatores como a prostaglandina E2 e o inibidor da leucemia (LIF), tornando-as mais evasivas à citotoxicidade das células NK em um ambiente alogênico (LIN; LIN; LUE, 2012).

Além de moléculas imunossupressoras, as CEM-TAh também secretam uma série de fatores solúveis que promovem a regeneração do tecido por meio de um mecanismo parácrino. O secretoma inclui fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores anti-apoptóticos como o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fatores hematopoiéticos como o estimulante de colônias e interleucinas (ONG; SUGII, 2013). Por outro lado, conforme apresentado na Tabela 1 e verificado pelo levantamento junto ao Clinical Trials USA (Dados de janeiro/2020 - www.clinicaltrials.gov), as CEM de medula óssea ainda ocupam a maior parte dos estudos clínicos (76,4%) em comparação com as CEM-TAh (11,2%), de cordão umbilical (8,9%) e da placenta (3,4%).

Indicação	Fonto colular	Dose para tratamento	
mulcação	Fonde Celular	clínico (células/dose)	
Lesão renal aguda	CEM-MOh	2 x 10 ⁸	
Infarto do miocárdio	CEM-MOh e outras	0,2-3,5 x 10 ⁸	
Isquemia crítica do membro	CEM-PLh	1,5-3 x 10 ⁸	
Deenee de Oreka		2,4 x 10 ⁷ (CEM-TAh)	
Doença de Cronn	CEM-TAN OU CEM-MON	6-12 x 10 ⁸ (CEM-MOh)	
Doença de fígado	CEM-TAh	0,1-1 x 10 ⁹	
Octocortrito		5-15 x 10 ⁷ (CEM-TAh); 3,5	
Osteoannie		x 10 ⁷ (CEM-MOh)	
Doença vascular periférica	CEM-SM	0,25-1 x 10 ⁸	
Artrite reumática	CEM-TAh	1-4 x 10 ⁸	
Diabetes tipo I	CEM-MOh	6 x 10 ⁸	
Diabetes tipo II	CEM-MOh	0,1, 0,3, 1 ou 2 x 10 ⁸	
Colite ulcerativa	CEM-MOh	1,8 x 10 ⁸	

Tabela 1 – Terapias alogênicas com o uso de diferentes fontes e quantidades/doses necessárias de CEM.

CEM-MOh: Células estromais mesenguimais derivadas de medula óssea humana;

CEM-PLh: Células estromais mesenguimais derivadas de placenta humana;

CEM-CUh: Células estromais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano;

CEM-SM: Células estromais mesenquimais derivadas de sangue menstrual humano.

Fonte: SIMARIA et al., 2014.

1.4 Cultura de CEM em suspensão

Independente da fonte da qual são obtidas as CEM, prossegue-se com a proliferação in vitro previamente à terapia celular. São necessários milhões de CEM humanas para uma única dose da terapia por paciente (Tabela 1), no entanto, os procedimentos usuais baseados na cultura estática 2D com frascos-T requer um manuseio extensivo, a produção é limitada à área de superfície disponível em cada frasco e o controle de pH, oxigênio e nutrientes é mais dificultado (RAFIQ; COOPMAN; HEWITT, 2013; SIMARIA et al., 2014; MA; TSAI; LIU, 2016; TOZETTI et al., 2017). Para superar estas limitações, a proliferação celular em suspensão (3D) baseada no uso de microcarregadores sob agitação em biorreatores de pequena ou larga escala tem sido uma alternativa metodológica para elevar o rendimento das células aderentes (RAFIQ; COOPMAN; HEWITT, 2013; HUPFELD et al., 2014). Esta tecnologia, onde células adaptadas à cultura em aderência proliferam sob partículas em suspensão em cultura sob agitação fornece uma área superficial significativamente maior por unidade de volume do biorreator quando comparadas com os frascos-T (RAFIQ; COOPMAN; HEWITT, 2013).

O cultivo das CEM aderentes em suspensão é possibilitado pelos microcarregadores (MC) (Figura 1), micropartículas de tamanho e formato variado (50 a 400 µm de diâmetro), de baixa densidade e produzidos com diferentes materiais (colágeno, dextrana, gelatina, poliestireno, celulose, entre outros), além de poderem receber coberturas especiais que conferem maior adesividade celular (carga elétrica, colágeno, fibrina etc.) ou com a presença de poros que permitem a fixação da célula no interior do MC (NILSSON, 1988; TAVASSOLI et al., 2018). Os MC ficam suspensos no meio de cultura sob agitação, o que promove a colisão com as células e a adesão quase homogênea, facilitando a proliferação e as condições de manutenção da cultura.

Os MC sólidos (ausentes de poros) (Figura 1A) e microporosos têm como desvantagens uma baixa relação área/volume, minimizando o potencial de proliferação celular por partícula (NG; BERRY; BUTLER, 1996), além da maior vulnerabilidade das células ao ambiente hidrodinâmico apresentado dentro do biorreator por causa da agitação (YUAN et al. 2014). Por outro lado, MC macroporosos (Figura 1B e 4) oferecem uma maior relação área/volume, além de proteger as células no interior dos poros das tensões hidrodinâmicas provocadas

pelo movimento do fluído e das colisões entre as micropartículas (NG; BERRY; BUTLER, 1996; CHEN; REUVENY; OH, 2013; CHEN et al., 2015).

Figura 1 – Diferentes tipos de microcarregadores comerciais disponíveis. MC sólido esférico: Cytodex 1 (A); Macroporoso: Cytopore (B); Hexagonal: Microhex 2D (C); Disco: Fibra-cel (D); Lente: Cytoline 1 (E) e Cytoline 2 (F); Cilíndricos: DE-52 (G) e DE-53 (H). Em I, é apresentada a morfologia de CTE humanas em (i) DE-53 (agregados grandes), (ii) Cytodex-1 (camadas agregadas finas) e (iii) Tosoh 65 PR (agregados compactos).



Fonte: adaptado de TAVASSOLI et al., 2018

A desvantagem na utilização de MC é a formação de agregados de MC contendo células (Figura 1I) o que dificulta a transferência de nutrientes para o interior do agregado e também prejudica a colheita das células. Microcarregadores de carga neutra e biodegradáveis (degradáveis pela digestão enzimática) são os mais recomendados por evitarem um alto nível de aglomeração (MIZUKAMI; SWIECH et al., 2018).

1.4.1 Biorreatores de pequena e larga escala para cultivo celular

Além da facilidade no ajuste da área superficial disponível para proliferação das células aderentes através da concentração de MC/litro de meio, outras vantagens no emprego de biorreatores é o escalonamento da proliferação celular e o controle de operação de todo o processo para mimetizar o ambiente *in vivo* das CEM, o que reflete na qualidade e consistência do produto final (RAFIQ; COOPMAN; HEWITT, 2013; MIZUKAMI; SWIECH, 2018). As principais categorias de biorreatores são os tanques agitados (Figura 2B) (incluindo os frascos *Spinner* de bancada – Figura 5), leitos fixos (Figura 2E), plataformas de oscilação em ondas

(Figura 2C) e sistemas de fibras ocas (Figura 2D). Dentre as opções atualmente disponíveis, os biorreatores tipo tanque com agitação são os mais recomendados quando o objetivo é a proliferação de CT em larga escala para terapia celular (PANCHALINGHAM et al., 2015; EAKER et al., 2017). Neste biorreator, os impelidores são utilizados para promover a mistura e suspensão, resultando em um sistema de cultura homogêneo, que permite monitorar e controlar os parâmetros da cultura e a constante remoção de amostras. Permite obter um grande número de células em um único recipiente o que evita a variabilidade comum na utilização de vários frascos-T (Figura 2A) e como consequência minimiza os custos relacionados à mão de obra e de consumíveis (MIZUKAMI; SWIECH, et al 2018).

Figura 2 – Representação esquemática de diferentes plataformas para cultura estática ou em suspensão de CEM.



Cada tipo de biorreator tem suas características e benefícios próprios (Tabela 2), porém a maioria permite visualizar em tempo real e ajustar automaticamente alguns parâmetros da cultura a valores pré-estabelecidos na configuração, tais como os níveis de dióxido de carbono e oxigênio dissolvido, temperatura e pH. Além disso, utilizam um sistema fechado de filtração de gás para evitar contaminações (RODRIGUES et al., 2011; EAKER et al., 2017; MIZUKAMI; SWIECH, 2018).

Atributos	Biorreator de tanque agitado	Biorreator de ondas	Biorreator de leito fixo	Biorreator de fibra oca
Homogeneidade	Sim	Sim	Não	Moderada
Controle e monitoramento dos parâmetros da cultura	Sim	Sim	Sim	Sim
Escalonamento	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Risco de contaminação	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Tensão de cisalhamento	Alto	Moderado	Baixo	Baixo
Transferência de oxigênio	Alto	Alto	Moderado	Alto
Modo de operação da cultura	Lote, lote alimentado, perfusão	Lote, lote alimentado, perfusão	Lote, lote alimentado, perfusão	Perfusão
Recuperação celular	Difícil	Difícil	Difícil	Fácil

Tabela 2 – Atributos dos principais biorreatores para cultivo em suspensão de CEM.

Fonte: adaptado de MIZUKAMI; SWIECH, 2018.

1.4.2 Cultura de CEM-TAh em biorreator e frasco spinner

Os parâmetros operacionais de um bioprocesso para proliferação de CEM em suspensão são críticos, considerando-se que para este tipo de célula sempre existe um balanço entre auto-renovação e diferenciação. Neste sentido, os maiores esforços realizados foram dirigidos na avaliação da composição dos meios de cultura para as CEM, as características do arcabouço ou microcarregador e ao monitoramento metabólico da cultura celular para manter as condições de homeostase (VAN DER SANDEN et al., 2010). No entanto, no que se refere as CEM-TAh, pouco se encontra na literatura sobre estudos que objetivam padronizar a metodologia de cultivo em diferentes sistemas de cultura. A grande parte dos trabalhos é com a utilização de CEM-MOh e, portanto, não permitem uma clara transposição do protocolo de cultivo para o tipo celular derivado do tecido adiposo. Como exemplo, em nosso grupo de pesquisa iniciamos os estudos com CEM-TAh em suspensão com a utilização dos microcarregadores Cytodex 1, o qual é um dos MC de maior uso na literatura para o cultivo de células aderentes, incluindo CEM, no entanto, quando utilizado com CEM-TAh as células tiveram grande sucesso de adesão, porém sua recuperação foi impossibilitada pela utilização de uma série de tratamentos (tripsina 0,25% ou 0,5% + EDTA 0,02% ou 0,04%; colagenase 0,15% ou 0,30% em diferentes tempos de ação, conciliado com banho termostático e métodos físicos por agitação dos MC em vórtex), ou seja, apesar de poder ser viável para outros tipos de CEM, com relação as CEM-TAh o tipo de microcarregador tem interferência na recuperação do cultivo (dados não publicados).

A Tabela 3 apresenta um levantamento bibliográfico de alguns exemplos de estudos com CEM-TAh em suspensão até aqui disponíveis. Apesar da consulta exaustiva a literatura, não foram encontrados muitos trabalhos com o intuito de estabelecer uma metodologia de cultivo desse tipo celular. O estudo mais detalhado com viés de otimizar um protocolo de cultura foi desenvolvido por Dos Santos e colaboradores (2014), que avaliaram diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e de regimes de renovação do meio de cultura na proliferação das CEM-TAh cultivadas em ambiente xeno-free em frasco spinner e biorreator. Os demais trabalhos partiam de um protocolo definido e avaliavam alternativas de um dos parâmetros do protocolo de cultivo, tais como a influência da velocidade ou tipo de impelidor (KAISER et al., 2013; SCHIRMAIER et al., 2014; JOSSEN et al., 2016), o cultivo com MC derivados de tecido adiposo humano (CHOI et al., 2011; YU et al., 2017) ou o cultivo sobre um protocolo xeno-free de acordo com as boas práticas de manufatura (SANTOS et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2014; CARMELO et al., 2015; CUNHA et al., 2017). Dessa forma, uma investigação conjunta mais detalhada de parâmetros básicos do cultivo, juntamente da influência da concentração celular inicial das CEM-TAh, ainda necessitam serem mais estudados visando a padronização e otimização para favorecer a eficiência do bioprocesso de proliferação ou diferenciação (RAFIQ; COOPMAN; HEWITT, 2013; HUNSBERGUER et al., 2017; LAWSON et al., 2017).
Tabela 3 – Levantamento literário de estudos realizados com CEM-TAh em cultura de suspensão tipo tanque agitado.

		Plataforma de	Concentração e tino	Condições de cultivo			
Referência	Objetivo de avaliação	cultura (volume de trabalho)	de microcarregador	Inóculo inicial	Tempo em cultura	Velocidade de agitação	Renovação de meio
RUBIN et al., 2007	Aderência e proliferação de CEM-TAh em MC do tipo gelatinoso	Frasco <i>Spinner</i> (40 mL)	200 mg - <i>Cultispher-S</i> (gelatinoso)	5,0 x 10 ⁴ células/mL	49 dias	15 rpm	50% a cada 2 ou 3 dias
CHOI et al., 2011	Proliferação de CEM-TAh em MC derivados de matriz extracelular de TAh (hECM)	Frasco <i>Spinner</i> (50 mL)	500 mg - hECM	4,0 x 10 ⁴ células/mL	10 dias	80 rpm	50% a cada 2 dias
SANTOS et al., 2011	Cultivo de CEM-TAh em condições <i>xeno-free</i>	Frasco <i>Spinner</i> (80 mL)	20 g/L - MC plástico não-poroso	5,0 x 10 ⁴ células/mL	14 dias	40 rpm	25% diariamente a partir do 3º dia
KAISER et al., 2013	Determinação do fluxo total de fluido e dos níveis de tensão de cisalhamento em cultivo	Frasco <i>Spinner</i> (100 mL)	515 cm² - <i>ProNectin-F</i> (plástico)	1,5 x 10⁴ células/mL	6 dias	7 a 105 rpm	50% no 4º dia
DOS	Escalonamento do cultivo <i>xeno-free</i> de CEM-TAh e o	Frasco <i>Spinner</i> (100 mL)	400 mg - MC plástico		4 dias	40 rpm	25% a cada 2
SANTOS et al., 2014	impacto das tensões de oxigênio dissolvido, e regimes de renovação do meio na proliferação e no metabolismo	Biorreator (800 mL)	não-poroso (transferidos no 4º dia para o biorreator)	5,0 x 10⁴ células/mL	7 dias	60 rpm	dias a partir do 3º dia

SCHIRMAIER et al., 2014	Escalonamento do cultivo de CEM-TAh de acordo com critérios de suspensão dos	Frasco <i>Spinner</i> (100 mL)	5 a 15 g/L - <i>ProNectin-</i> <i>F</i> (plástico)	5-10 x 10 ³ células/mL	7 a 8 dias	60 rpm	15% quando 3,0 x 10 ⁴ células/cm ⁻²
	MC	Biorreator (2 L)	5 a 10 g/L - <i>ProNectin-</i> <i>F</i> (plástico)		7 a 10 dias	100 a 140 rpm	Não informado
CARMELO et al., 2015	Otimização das condições de cultivo de CEM-TAh em condições <i>xeno-free</i>	Frasco <i>Spinner</i> (80 mL)	1,6 g - <i>Pall SoloHill</i> (plástico)	1,0 x 10 ⁵ células/mL	8 dias	40 rpm	25% diariamente
FERNANDES- PLATZGUMMER	Avaliação de dois protocolos de escalonamento da cultura	Frasco Spinner (80 mL)	40 g/L - MC Synthemax //	1,0 x 10⁵ células/mL	7 dias	40 rpm	25% diários do 4º ao 7º dia
et al., 2016	de CEM-TAh em condições <i>xeno-free</i>	Biorreator (800 mL)	(plástico)	2,0 x 10 ⁵ células/mL	Não informado	60 rpm	25% cada 2 dias
JOSSEN et al., 2016	Influência da velocidade do impelidor na proliferação celular e na formação de agregados	Frasco <i>Spinner</i> (100 mL)	360 cm ² - MC de poliestireno	3,0 x 10 ³ células/cm ⁻²	8 dias	25 a 120 rpm	50% no 4º dia
CUNHA et al., 2017	Escalonamento do cultivo de CEM-TAh de acordo com as boas práticas de manufatura	Frasco <i>Spinner</i> (120 mL) Biorreator (2 L)	16 g/L - MC Synthemax II (plástico)	2,5 x 10 ⁴ células/mL	7 dias	45 rpm 100 rpm	50% no 5º dia -
YU et al., 2017	Comparação entre o cultivo com o uso de MC gelatinoso ou o derivado de tecido adiposo humano (DAT)	Frasco <i>Spinner</i> (125 mL)	125 mg - <i>Cultispher-S</i> (gelatinoso) ou DAT	3,5 x 10 ⁴ células/mL	1 mês	25 rpm	50% a cada 2 ou 3 dias

1.5 Monitoramento das condições de cultivo das CEM

A capacidade de monitoramento e controle, que é possível em sistemas de cultivo com biorreatores, representa um recurso adicional para o desenvolvimento de bioprocessos para a geração de produtos celulares com maior robustez e estabilidade necessária para a terapia celular em escala ampliada (RODRIGUES et al., 2011; HUNSBERGUER et al., 2017). Entretanto, os processos nos cultivos de CEM não são lineares e estacionários, assim, sua reprodutibilidade e controle só podem ser alcançados por meio de uma adequada metodologia de monitoramento das principais variáveis do bioprocesso (ELSEBERG; SALZIG; CZERMAK, 2014; ELSEBERG et al., 2017).

Partindo desses pressupostos, a combinação dos dados cinéticos de proliferação, com métodos bioquímicos e espectroscópicos pode ser utilizada para fornecer a relação entre a composição do meio de cultura (nutrientes e metabólitos), com o número de células em dado momento do processo (VOJINOVIC; CABRAL; FONSECA, 2006; LEME et al., 2014). Entre as técnicas espectroscópicas, a espectroscopia de absorção do infravermelho tem sido amplamente explorada para este propósito em diversas culturas (PETIOT et al., 2010; SALES et al., 2015; ROSA et al., 2016; DING et al., 2017), podendo ser usada, por exemplo, para detecções de glicose, lactose, frutose, glutamina, glutamato, prolina, amônia e dióxido de carbono (VOJINOVIC; CABRAL; FONSECA, 2006). Além disso, na atualidade também é requerido o monitoramento de vários marcadores celulares de superfície via citometria de fluxo e de diferenciação celular para caracterização da amostra celular cultivada como CTM (DOMINICI et al. 2006).

1.6 Monitoramento da integridade e estabilidade genômica do cultivo

Um dos aspectos mais importantes relacionados à cultura de CT consiste na manutenção da integridade e estabilidade genômica durante o processo de cultivo e proliferação celular (LAMBERT et al., 2011). O material genético está sujeito a danos durante os procedimentos de cultura celular, tanto por fatores endógenos quanto exógenos, e anteriormente ao uso clínico, a proliferação extensiva em larga escala pode resultar em envelhecimento celular, o que promove defeitos no sistema de reparo e apoptose que estão intrinsecamente relacionados com o desenvolvimento de cânceres e doenças degenerativas, além do envelhecimento poder alterar

algumas de suas propriedades morfológicas e funcionais de proliferação, imunofenotipagem e diferenciação (WILSON; BOHR, 2007; KHADEMI-SHIRVAN et al., 2020) (Figura 3).



Figura 3 – Alterações passíveis de ocorrerem em uma CEM senescente.

Fonte: adaptado de KHADEMI-SHIRVAN et al., 2020.

Dessa maneira, o grande desafio na proliferação em larga escala de CEM é o monitoramento "on-line" ou "at-line" do sistema para a rápida detecção de falhas na estabilidade genética da linhagem celular (RAFIQ; COOPMAN; HEWITT, 2013; ELSEBERG et al., 2017). Portanto, além de análises físico-químicas, é imprescindível a utilização de ferramentas que garantam ou monitorem a qualidade genética do cultivo das CEM *in vitro* para que se possa conferir maior segurança aos procedimentos que utilizem estas células para a terapia celular.

Entre os testes de genotoxicidade disponíveis, o ensaio cometa e o teste do micronúcleo são reconhecidos devido a sua robustez, sensibilidade e poder estatístico para avaliar quebras no DNA, consideradas características de mutagenicidade (HEUSER et al., 2008). Além disso, a OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) preconiza que a associação entre o ensaio cometa e o teste do micronúcleo é a melhor bateria de testes disponíveis

para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico uma vez que ambos são altamente sensíveis, simples e permitem detectar, respectivamente, quebras em níveis cromáticos e cromossômicos (OECD, 2016a,b).

Apesar da recomendação, são escassos os estudos com avaliação genotóxica das CEM independente da escala de produção ou método de cultivo. Os trabalhos disponíveis avaliaram em sua maior parte a senescência celular em função do número de passagens ou do doador da CEM (DANOVIZ et al., 2011; ALT et al., 2012; FUCHS et al., 2012; FROELICH et al., 2013; WAN KAMARUL ZAMAN et al., 2014), o efeito do meio de diferenciação neuronal (LAMBERT et al., 2011) ou de compostos químicos (SHAKOORI; AHMAD, 2013) sob a estabilidade genética de CEM-TAh, o potencial tumorigênico das células induzidas ao dano no DNA (ALTARENOVA et al., 2009), o efeito do pH do cultivo (HERMETO et al., 2015), e a eficiência do protocolo de indução de micronúcleos em CEM-TAh (CORNÉLIO et al., 2014). Estudos que correlacionem um protocolo otimizado de alto rendimento celular com avaliação simultânea da integridade genética das células do cultivo através do teste do micronúcleo ou ensaio cometa estiveram ausentes na literatura.

1.6.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de células individualizadas, foi introduzida por Ostling e Johanson (1984) e adaptada para o método alcalino por Singh e colaboradores (1988). A técnica permite a desnaturação do DNA para detecção de quebras de fita simples ou dupla, e, por consequência, tornou-se o ensaio mais utilizado e recomendado devido ao seu amplo espectro de detecção de danos ao DNA (TICE et al., 2000; HARTMANN *et al.*, 2003). O ensaio cometa pode ser realizado com qualquer população de células eucarióticas e é adequado para uma ampla gama de aplicações, incluindo os danos ao DNA devido às espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (SCHRAML et al., 2009; CAO et al. , 2010). Embora atualmente já existam disponíveis outras técnicas altamente sofisticadas como a hibridação genômica comparativa de matrizes (BAPTISTA et al., 2008; PFRAGNER et al., 2009), o ensaio cometa mantém-se em uso, pelo menos para fins de triagem, porque é simples, rápido e econômico (FUCHS et al., 2012).

As quebras nas cadeias de DNA podem ser visualizadas no ensaio cometa pelo aumento da migração de segmentos de DNA livres, resultando em um aspecto

semelhante a um cometa (Figura 8E), justificando o nome do ensaio (AZQUETA; COLLINS, 2013; GODSCHALK et al., 2013). Para sua análise, a OECD (2016a) recomenda a utilização da quantificação automatizada ou semi-automatizada, no entanto, o método visual possui preferência por alguns pesquisadores (COLLINS et al., 2008; CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2012; ARALDI et al., 2013a, 2014), pois evita que os nucleoides sobrepostos possam ser quantificados como um único cometa (VILLAS-BOAS, 2018). Outro problema associado aos sistemas automatizados é o reconhecimento de cometas *hedgehog* (chamados de cometa ouriço, "células-fantasma", "nuvens" ou "núcleo celular não detectável") (Figura 8F), células com elevado dano ao DNA com características de células necróticas ou apoptóticas com cabeças pequenas ou inexistentes e caudas largas e difusas. Nestes casos, os *softwares* podem analisar a cabeça separadamente da cauda, classificando esses cometas como classe zero (AZQUETA; COLLINS, 2013).

A técnica do ensaio cometa possui variações que se distinguem apenas pelo pH do tampão de eletroforese empregado: o ensaio ácido, o alcalino e o neutro. O ensaio alcalino é conhecido por propiciar a detecção de quebras de fita simples (SSBs, do inglês *Simple Strand Breaks*) e quebras de fita dupla (DSBs, do inglês *Double Strand Breaks*) (HARTMANN *et al.*, 2003; AZQUETA; COLLINS, 2013). Tanto as fragmentações do tipo SSBs como DSBs estão associados a aberrações cromossômicas e instabilidade genômica (PFEIFFER; GOEDECKE; OBE, 2000). A instabilidade genômica está diretamente associada à malignidade (CHARAMES; BAPAT, 2003) e, consequentemente, uma CEM instável apresentará risco maior para uma terapia celular.

Apesar de suas limitações de inferência, um importante campo de aplicação do ensaio cometa está nas avaliações de senescência (FUCHS et al., 2012), pois o processo de envelhecimento celular é acompanhado de uma geração aprimorada de ROS (PASSOS; VON ZGLINICKI, 2006; SCHRAML et al., 2009; TOWER, 2012), instabilidade genômica (BURHANS; WEINBERGER, 2007) e desregulação da morte celular (ZHENG et al., 2005; HINKAL et al., 2009). No entanto, para o uso das CEM na medicina regenerativa, é necessária sua proliferação *in vitro* em larga escala previamente a aplicação terapêutica, o que torna as CEM sujeitas as alterações associadas à senescência que incluem a diminuição do potencial proliferativo, acumulação de SA- β -gal (Senescência Associada a β -Galactosidase), encurtamento de telômeros, dano ao DNA e alterações contínuas na expressão gênica (FEHRER;

LEPPERDINGER, 2005; BONAB et al., 2006; WAGNER et al., 2008, SCHALLMOSER et al., 2010). Por conta disso, recomenda-se, juntamente com o ensaio do cometa, um teste mutagênico para detecção de micronúcleos (WAGNER et al., 2010).

1.6.2 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é um importante biomarcador *in vivo* e *in vitro*, amplamente utilizado na epidemiologia molecular e nas pesquisas que envolvem danos citogenéticos em populações expostas a agentes genotóxicos (ARALDI et al., 2013b). O termo micronúcleo (MN) foi introduzido em 1951 e se relacionava a fragmentos acêntricos expulsos do núcleo das células nos estágios tardios da anáfase (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003) e podem ser formados através de dois mecanismos: rupturas cromossômicas (clastogênese) ou perdas de cromossomos (aneugênese) (BONASSI et al., 2007; SWAPAN; DEY, 2010). Esses eventos propiciam a formação de um núcleo de pequeno tamanho, envolto por uma membrana nuclear separado do núcleo principal, mas corado similarmente a este, devido ao seu conteúdo de DNA (Figura 9B e 9D) (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo é recomendado nos estudos de genotoxicidade (OECD, 2016b), especificamente nas avaliações de mutagenicidade, e pode ser aplicado a qualquer célula eucariótica, sendo, preferencialmente usado em substituição ao teste de aberrações cromossômicas, por não requerer a análise de cariótipo (MILLER et al., 1997; NORPPA; FALCK, 2003), em consequência seu procedimento é mais rápido e facilitado.

O emprego da técnica do micronúcleo com o uso de citocalasina-B foi proposto inicialmente por Fenech e Morley em 1985. A citocalasina impede a polimerização da actina, bloqueando o processo de citocinese (ALBERTS, 2005). Induzindo o bloqueio da citocinese, Fenech e Morley (1985) resolveram o problema de sincronia da mitose em culturas celulares. Essa abordagem permite a identificação de quantas divisões mitóticas foram realizadas por uma célula após os tratamentos experimentais em função da presença de células mononucleadas, binucleadas ou polinucleadas.

Segundo Fenech (2000), alguns critérios devem ser levados em consideração no momento da análise dos micronúcleos tais como, o número de células binucleadas, o número total de micronúcleos em cada célula binucleada e a

frequência de MN em 1000 células binucleadas. Além disso, segundo o autor, um micronúcleo deve estar totalmente isolado e apresentar morfologia e coloração idênticas aos núcleos principais, com seu diâmetro variando entre 1/16 e 1/3 das medidas desses.

Em comparação ao ensaio cometa, o teste do micronúcleo apresenta algumas vantagens como: considerar apenas danos genéticos em células mitóticas, enquanto que o ensaio do cometa detecta danos no DNA tanto na interfase quanto nas células mitóticas e possuir maior poder estatístico, já que analisa mais de 1000 células, enquanto que no ensaio do cometa apenas 100 células por amostra são analisadas (MILLER et al., 1998). No entanto, embora o teste do micronúcleo possua tais vantagens, estudos de toxicologia genética reforçam a necessidade de mais de um teste de genotoxicidade simultaneamente (ÇELIK et al., 2014). Assim, a associação do teste do micronúcleo ao ensaio cometa pode ser considerada como um padrão-ouro entre os testes genotóxicos, visto que se complementam e possuem alta sensibilidade, poder estatístico, simplicidade, versatilidade, baixo custo e rapidez (VILLAS-BOAS, 2018).

Tendo em vista que no contexto da medicina regenerativa as terapias celulares com CEM poderão representar uma mudança de paradigma na saúde humana, é importante o desenvolvimento de protocolos de cultivo que conciliem a qualidade do produto final com a eficiência no processo de proliferação e coleta das CEM. Para isso são necessários a retenção dos principais atributos celulares com relação à identidade, potência, pureza e segurança, sem interessar a aplicação terapêutica específica (ELSEBERG; SALZIG; CZERMAK, et al., 2014). Deve-se, portanto, estabelecer um processo de cultivo e proliferação das CEM-TAh sob adequado monitoramento das condições de cultura celular que permita sua exequibilidade e reprodutibilidade metodológica, partindo da cultura estática e adaptação ao cultivo em pequena escala em frasco spinner, até a larga escala realizada em biorreator. O estabelecimento de um sistema de cultivo que incorpore a cinética celular, parâmetros de cultura físico-químicos e variáveis citogenéticas se constitui, portanto, na contribuição inédita deste trabalho que pretende desenvolver um bioprocesso em condições operacionais ótimas, fornecendo um meio para a compreensão dos efeitos de múltiplos parâmetros sobre a dinâmica de populações celulares específicas, neste caso, sobre as CEM-TAh.

43

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Propor uma metodologia para proliferação de CEM-TAh em biorreator tipo tanque agitado, visando estabelecer um sistema de proliferação robusto que concilie eficiência no rendimento celular com menor prejuízo a qualidade genética do cultivo.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos são:

- a. Determinar as melhores condições de cultivo das CEM-TAh em cultura estática como forma de preparação dos inóculos para cultura em suspensão;
- b. Definir uma metodologia para o cultivo em suspensão das CEM-TAh em menor escala com a utilização de frascos spinners de bancada.
- c. Definir os parâmetros de operação de um biorreator tipo tanque agitado e aerado para a proliferação em larga escala de CEM-TAh;
- d. Avaliar a integridade genômica das CEM-TAh em culturas no biorreator;
- e. Relacionar a cinética de proliferação celular com atributos que atestam a viabilidade, estabilidade genética e identidade das CEM-TAh cultivadas in vitro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e condicionamento do tecido adiposo

As CEM foram obtidas a partir do tecido adiposo humano de indivíduos do sexo feminino, com idade entre 30 e 45 anos após serem submetidas ao procedimento de dermolipectomia abdominal executados na clínica de cirurgia estética *La Fuente de La Juventude* na cidade de Assis, SP, Brasil. As doadoras foram devidamente esclarecidas a respeito da pesquisa e, estando de acordo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A), autorizando a utilização do material biológico. O tecido adiposo obtido (100 a 300 g) foi fracionado e acondicionado em tubos de centrífuga de 50 mL estéreis contendo tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 (13-30258-05, LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 2% de antibiótico-antimicótico (BR30331-01, LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), permanecendo em repouso por 2 h a 4º C para prevenir contaminações.

3.2 Isolamento e cultura das CEM-TAh

Após o período de desinfecção, o tecido adiposo foi fragmentado e devolvido aos tubos de 50 mL contendo 10 mL da solução de colagenase tipo I 0,15% (17018-029, Gibco, Nova York, EUA) para digestão enzimática em incubação com banho termostático a 37°C por 1 h 30 m, seguido de centrifugação por 5 m a 676 G. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi suspenso em meio de cultura alpha modified eagle medium (aMEM) (BR30007-05, LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (10Bio500, LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e 1% de antibiótico-antimicótico (AA). Em seguida, a solução homogeneizada foi filtrada em uma unidade de 70 µm (352350, BD Falcon, Mississauga, Canadá) acoplada a um tubo de centrífuga de 50 mL para separação dos debris teciduais. A suspensão resultante foi centrifugada durante 5 m a 314 G. O pellet celular obtido foi ressuspenso em meio de cultura e semeado em frascos-T de 150-182 cm² em meio de cultura αMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de AA e incubadas em estufa a 36,5º C com 5% de CO₂ por 24 h para adesão. Após este período, o meio de cultura foi descartado e as CEM-TAh da cultura primária que ficaram aderidas a superfície dos frascos-T foram submetidas a uma lavagem com PBS suplementado com 1% de AA por 10 m. Após o descarte do PBS, cada frasco-T foi reabastecido com meio suplementado e as CEM-TAh foram mantidas em estufa a 36,5° C com 5% de CO₂ para proliferação com renovação parcial (50%) do meio a cada 72 h de cultivo.

3.3 Tripsinização, criopreservação e descongelamento das CEM-TAh

Ao atingirem 80-90% de confluência nos frascos-T as células aderidas foram lavadas com PBS e submetidas à solução de Tripsina-EDTA 0,25% (T4049-500ML – Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) por um período de incubação em estufa suficiente para a dissociação celular (5 a 20 m), em seguida a enzima foi inibida pela adição de meio suplementado com 10% de SFB e a suspensão celular foi centrifugada em tubos de 50 mL a 314 G por 5 m. O *pellet* foi suspenso em meio de cultura e a densidade de células viáveis foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, com a utilização de Azul de Trypan. Em seguida, as células obtidas em 1ª passagem foram criopreservadas em solução de congelamento contendo 70% de meio α MEM, 20% de SFB e 10% de dimetilsufóxido (DMSO) estéril, e fracionadas a uma concentração de 1,0 x 10⁶ por tubo criogênico. Os criotubos foram mantidos por 30 m em freezer -20° C para congelamento gradual e em seguida destinados ao freezer -80° C. Para longos períodos de armazenamento os criotubos foram conservados em nitrogênio líquido a -196° C até o momento de utilização nos experimentos com cultura estática e em suspensão.

Para utilização experimental, os criotubos foram descongelados em temperatura ambiente, e o meio de congelamento foi transferido para um tubo estéril de 15 mL para ser centrifugado a 392 G por 5 m, seguido de suspensão do *pellet* em PBS para lavagem e remoção do DMSO, e de uma nova centrifugação a 392 G por 5 m. O pellet celular de CEM-TAh em 1ª passagem foi suspenso em meio de cultura suplementado (10% SFB e 1% AA) e semeado em frascos-T até atingirem a concentração celular necessária para a execução do experimento de padronização da cultura estática (Apêndice A) ou para inoculação aos experimentos de cultura em suspensão em frasco *spinner* e biorreator.

3.4 Recuperação e contagem celular em câmara de Neubauer

Para obtenção das quantificações celulares em cada sistema de cultivo foi utilizada a câmara de Neubauer. Na contagem celular da cultura estática (frascos-T)

as amostras foram obtidas após a suspensão do tripsinizado celular em meio de cultura e coleta de 10 µL para contagem.

Para recuperação celular das culturas em suspensão (frasco spinner ou biorreator), a amostra celular foi obtida diariamente pela coleta de 2 mL do meio de cultura sob agitação, seguido de filtragem em unidade de 70 µm para separação das células aderidas aos microcarregadores (MC) Cultispher-S (Figura 4) e das nãoaderidas que atravessaram o filtro. As células não aderidas suspensas nos 2 mL de meio de cultura filtrado foram centrifugadas em tubos de 15 mL por 392 G por 5 m e o pellet foi suspenso em 1 mL de meio de cultura onde foi recolhido 10 µL para quantificação celular e obtenção da porcentagem de células não aderidas aos MC (Equação 5). Os MC que ficaram contidos no filtro foram invertidos em um tubo de 50 mL através da lavagem do filtro com PBS. Após decantação dos MC e remoção do PBS foi adicionado 1 mL da solução de Tripsina-EDTA 0,25% que foi mantida em banho termostático a 37° C até a completa digestão dos MC (15 a 30 m com agitação manual ocasional). A enzima foi inativada com a adição de meio suplementado com 10% de SFB, e em seguida a suspensão celular foi centrifugada a 392 G por 5 m. O pellet celular resultante foi suspenso em 1 mL de meio de cultura suplementado do qual foram recolhidos 10 µL para o procedimento de contagem e obtenção da viabilidade das células aderentes aos MC.

Os 10 µL de células em suspensão foram homogeneizados com 10 µL do corante Azul de Trypan para exclusão das células inviáveis (coradas em azul). Dessa solução, 10 µL foram recolhidos para a quantificação celular em cinco quadrantes da câmara de Neubauer em microscópio óptico de luz (COVAS; ZAGO, 2006). A concentração de células por mL da cultura estática foi calculada através da Equação 1 e o número de células totais obteve-se pela multiplicação desse valor pelo volume de meio que continha as células em suspensão pós-tripsinização.

Nas culturas em frasco *spinner* ou biorreator a concentração de células por mL aderidas e não-aderidas aos MC, foi dada pela Equação 2 e a concentração celular total do cultivo pela Equação 3:

> $X = \frac{N}{Q} \times Fd \times 10^{4}$ (Equação 1) $X = \frac{N}{Q} \times Fd \times 10^{4} \div 2$ (Equação 2) $Xc = X \times V$ (Equação 3)

Onde X é a concentração de células/mL das CEM-TAh cultivadas na cultura estática ou em suspensão; N é a soma da quantidade de células presentes nos cinco quadrantes da câmara de Neubauer; Q é a quantidade de quadrantes da câmara de Neubauer quantificados (= 5); Fd é o fator de diluição utilizado para a amostra celular (no caso, pela soma dos 10 µL das células tripsinizadas em suspensão com os 10 µL de azul de trypan obtém-se um Fd = 2); 10^4 é o fator de potência da câmara de Neubauer (mL⁻¹); 2 é a divisão pelo volume de meio recolhido sob agitação para obtenção de um X equivalente a 1 mL do meio em cultivo; Xc é o número total de CEM-TAh presentes na cultura em suspensão e V é o volume total de meio de cultura utilizado nas culturas em frasco *spinner* ou biorreator multiplicado pelo X obtido da Equação 2.

A viabilidade celular (*Vb* em %) para cada quantificação foi calculada pela razão entre o número de células viáveis (*Nv*) e o número de células totais (*Nt*) (células viáveis e inviáveis) multiplicados por 100, conforme apresentado na Equação 4:

$$Vb = \frac{Nv}{Nt} \times 100$$
 (Equação 4)

Da mesma forma, a eficiência de adesão celular (*Ead* em %) calculada para os experimentos da fase de inoculação em frasco *spinner* ($S_1 a S_9$), foi definida pela razão entre o número de células aderidas (*Ad*) e o número de células totais (*At*) (células aderidas e não aderidas), multiplicado por 100, conforme apresentado na Equação 5:

$$Ead = \frac{Ad}{At} \times 100$$
 (Equação 5)

As contagens foram realizadas em quadruplicata para cada amostra recolhida. A partir das equações foram construídos os gráficos da concentração de células/mL ou por cm² pelo tempo de cultivo em horas (h) de cada situação experimental, representando a curva de crescimento do cultivo das CEM-TAh em cultura estática ou em suspensão, assim como a porcentagem de viabilidade celular de cada caso. Para os experimentos da fase de inoculação em frasco *spinner*, os gráficos foram construídos apresentando a porcentagem de células aderidas dentre a quantidade de células quantificadas em cada uma das contagens realizadas ao longo das 24 h de cultivo, acompanhado de sua viabilidade (%).

3.5 Cultura das CEM-TAh em frascos-T

Os primeiros experimentos conduzidos com CEM-TAh foram em cultura estática com a utilização de frascos-T de 25 cm² (SIMÃO et al., 2019) (Apêndice A). Foi avaliada a cinética de proliferação celular em diferentes volumes de meio de cultura α MEM (5, 10 ou 15 mL) suplementado com 10% de SFB e 1% de AA e os níveis dos nutrientes e metabólitos que poderiam influenciar no rendimento celular. Para isso CEM-TAh em 1ª passagem foram distribuídas a uma densidade celular de 3.000 células/cm² para cada frasco-T em triplicata para cada dia de cultivo (1º ao 8º / 24 a 192 h) por grupo experimental (5, 10 ou 15 mL) em celular.

Ao final de cada dia de cultivo (24 a 192 h), amostras em triplicata de cada grupo experimental foram recolhidas para a obtenção das alíquotas de meio de cultura destinadas à análise de absorção do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (sessão 3.12) e bioquímica para dosagem metabólica (sessão 3.13). A seguir, as células de cada frasco foram tripsinizadas e a densidade e viabilidade celular de cada frasco por grupo foi determinada. O regime adotado de renovação do meio de cultura (50%) foi a cada 48 h, sendo as alíquotas coletadas previamente a troca de meio. Também ao final do experimento, partes das células totais dos três experimentais foram conduzidas grupos aos ensaios de caracterização imunofenotípica (sessão 3.19) e de diferenciação celular in vitro (3.20).

3.6 Preparação dos microcarregadores

Para os experimentos das culturas em suspensão com frasco *spinner* e biorreator, foi utilizado o microcarregador (MC) Cultispher-S (DG-2001-OO, Percell Biolytica, Åstorp, Suécia) cujas especificações técnicas do produto são apresentadas na Tabela 4. A concentração de uso adotada foi de 1 g do MC Cultispher-S (Figura 4) por litro de meio de cultura. Previamente a utilização experimental, os MC foram preparados conforme protocolo do fabricante com pequenas modificações. Os MC foram hidratados com água destilada (50 mL/g) por 1 h e esterilizados em autoclave por 20 m a 120° C e 14,2 psi. Em seguida, os MC foram lavados 2x com PBS e mantidos a 4° C por até 7 dias até a data do uso. Anteriormente a inoculação, o PBS foi descartado e os MC foram mantidos por 2 h em banho termostático a 37° C com meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de SFB para condicionamento.

Material	Matriz gelatinosa macroporosa altamente reticulada
Estabilidade	Alta estabilidade térmica e mecânica
Carga elétrica	Ausente
Cobertura superficial	Ausente
Diâmetro	130-380 μm
Densidade	1.02-1.04 g/cm³ a 25° C
Área superficial	15.000 cm²/g
Hidratável	Sim
Esterilizável	Sim
Digestão	Solução de protease a 37° C por 15 a 30 m

Tabela 4 – Especificações técnicas do microcarregador Cultispher-S.

Fonte: Data sheet do fabricante, disponível em: http://www.percell.se/inst_s.pdf; YUAN et al., 2014.

Figura 4 – Microcarregador gelatinoso Cultispher-S visualizado em microscopia eletrônica. A imagem evidencia sua natureza macroporosa que propicia uma área de adesão celular significativa para as CEM-TAh, além de conferir maior proteção às células contra o cisalhamento.



Fonte: PETTERSSON, 2009.

3.7 Cultura das CEM-TAh em frasco spinner

Para a definição dos parâmetros iniciais de uma cultura celular em suspensão, foram utilizados frascos de cristal borosilicato do tipo *Spinner* (Bellco Glass, Vineland, EUA) obtidos do Laboratório de Biotecnologia Viral do Instituto Butantan – USP, com capacidade para 125 mL, contendo braços laterais para inoculação, amostragem e troca de gases e um eixo impelidor central com uma barra magnética acoplada em uma pá vertical de teflon e um suporte que realiza a rotação sobre uma barra de vidro ajustável (Figura 5). Para agitação do meio de cultura contendo os MC, os frascos *spinner* foram posicionados sobre uma mesa agitadora magnética com capacidade para a manutenção e regulação da velocidade de agitação e suporte para 4 frascos. O equipamento ficou alojado no interior de uma estufa a 36,5° C e 5% de CO₂. Anteriormente a utilização em cultura, os frascos *spinners* foram tratados com o silicone antiaderente Sigmacote (SL2-100ML, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e esterilizados por 25 m a 120° C e 14,2 psi.

Figura 5 – Modelo de frasco *spinner* utilizado. São observados os dois braços laterais de inoculação/amostragem e o eixo impelidor central formado pela barra de vidro com altura ajustável pela parte externa da tampa, e a parte interna contendo o suporte plástico que realiza a rotação pela presença de uma barra magnética.



Fonte: Catálogo Bellco Glass (disponível em: https://bellcoglass.com/product/flat-bttm-ahb-spin-250ml-no-ctr-cap/, acesso em 20/01/2020). ISMADI; HOURIGAN; FOURAS, 2014.

Um resumo dos experimentos conduzidos em duplicata em frasco *spinner* é apresentado na Tabela 5. Foram analisados diferentes parâmetros sequencialmente, de forma que após a obtenção do melhor resultado, o parâmetro ficou definido para os demais experimentos e assim sucessivamente. Uma descrição mais detalhada de cada experimento é apresentada no decorrer do item 3.2 (resultados).

Para os experimentos em frasco *spinner* foram utilizados CEM-TAh de 2ª até 4ª passagem de duas doadoras distintas (Tabela 5). O meio de cultura foi o α MEM suplementado com 10% de SFB (exceção aos experimentos S₇ e S₈) e 1% de antibiótico-antimicótico. A concentração do MC Cultispher-S foi fixada em 1 g/L, dessa forma cada frasco conteve 125 mg do MC para um volume de trabalho de 125 mL. A concentração celular inicial foi dada em células/mL e seu valor proporcional para cada microcarregador. O inóculo variou de acordo com o experimento conduzido. Para os primeiros experimentos (S₁ a S₄, Tabela 5), a concentração celular foi de 7,2 x 10³ células/mL equivalente a nove células por MC (9:1) ou 480 células/cm². No S₅ e S₆ as concentrações foram de 30:1 (2,4 x 10⁴ células/mL; 1600 células/cm²) e 60:1 (4,8 x 10⁴ células/mL; 3200 células/cm²), respectivamente.

Inicialmente cada experimento apresentou 125 mg de MC e o inóculo para 125 mL em 50% (63 mL) do volume total de trabalho até as seis primeiras horas de cultivo a fim de potencializar a adesão celular, em seguida o volume foi completado para os 125 mL de meio de cultura. Exceção foi para os experimentos da fase de inoculação que permaneceram com os 50% até o final das 24 h. O regime de adesão intermitente se baseou nos trabalhos de CARUSO et al., 2014 e YUAN et al., 2014 com pequenas modificações: após a inoculação e homogeneização das células e dos MC no frasco *spinner*, o meio de cultura foi mantido estático (0 rpm) por 27 m, em seguida foi administrada a agitação a 70 ou 100 rpm por 3 m. Esse processo foi repetido por 6x até atingir as primeiras 3 h de cultivo, no que se seguiu para um período de 3 h estático. Ao final, a agitação foi restaurada e mantida de forma continua em 50 ou 70 rpm até a conclusão do experimento (Tabela 5).

Para os experimentos realizados durante o período de inoculação ($S_1 a S_8$), a recuperação e contagem celular (sessão 3.4), ocorreu as 4, 8, 12 e 24 h de cultivo para avaliação da condição que fornecesse a melhor eficiência de adesão. No período proliferativo ($S_9 a S_{16}$), as contagens ocorreram uma única vez ao dia, todos os dias (24 a 216 h), para se avaliar o melhor rendimento celular ao longo do cultivo. Em ambos os períodos avaliados, a viabilidade celular também foi verificada.

Período de avaliação	Parâmetro avaliado	Sigla	Descrição				
	Pogimo o	S 1	Intermitente com 70 rpm				
	Keyime e	S ₂	Intermitente com 100 rpm				
	do ogitoção	S₃	Contínua com 70 rpm				
Inoculação	ue agliação	S ₄	Contínua com 100 rpm				
(4 a 24 h)	Inóculo	S₅	Proporção célula/MC de 30:1				
	inicial	S ₆	Proporção célula/MC de 60:1				
	SEB	S ₇	Ausente de SFB				
	010	S ₈	Concentração de 20% de SFB				
	Velocidade	S ₉	50 rpm ao longo do cultivo				
	de agitação	S ₁₀	70 rpm ao longo do cultivo				
	Regime de	S ₁₁	Renovação de 0% ao longo do cultivo				
Proliferativa	renovação	S ₁₂	Renovação de 25% a cada 48 h a partir do 3º dia				
(24 a 216 h)	do meio de	S ₁₃	Renovação de 50% a cada 48 h a partir do 3º dia				
	cultura	S ₁₄	Renovação de 50% a cada 72 h a partir do 3º dia				
	Doadores	S 15	Rendimento das células do Doador 1				
	Duaudies	S ₁₆	Rendimento das células do Doador 2				

Tabela 5 – Resumo dos experimentos em duplicata conduzidos em frasco spinner.

Baseado no trabalho de YUAN et al., 2014 com modificações. O experimento S₁ também foi comparado estatisticamente com os experimentos S₅ e S₆ (9:1; 30:1 e 60:1, respectivamente) e com o S₇ e S₈ (10, 0 e 20% de SFB, respectivamente), por ter apresentado a melhor eficiência de adesão dentre os S₁ a S₄. Da mesma forma, o S₉ com 25% de renovação a cada 72 h também foi comparado com o S₁₁ a S₁₄ por ter tido o melhor rendimento celular comparativamente ao S₁₀ de igual regime.

3.8 Cultura das CEM-TAh em biorreator

Para avaliação do rendimento celular de CEM-TAh em uma cultura de suspensão em larga escala foi utilizado um biorreator tipo tanque com agitação mecânica e aeração, com capacidade de 1 L (New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) (Figura 6A). O equipamento consta com aquecimento via camisa d'água e agitação por impelidor central fixo, do tipo hélice com três pás em ângulo de 45°. Para sua utilização o biorreator foi montado e esterilizado em autoclave por 25 m a 120° C e 14,2 psi, e posteriormente mantido *overnight* em temperatura ambiente para arrefecimento da água na camisa e do interior da dorna antes do protocolo de remoção para inoculação.

O aparato do biorreator possuía uma via de remoção de meio de cultura de alcance até o fundo da dorna, outra de amostragem posicionada até a altura do volume de 300 mL e uma de inoculação pelo cabeçote. Tais vias eram conectadas por mangueiras de silicone esterilizadas, associadas às bombas peristálticas de rotação e bombeamento. Além disso, havia sensores para monitoramento da temperatura interna de líquidos, uma via para aspersão de gases (ar comprimido, CO_2 , $N_2 e O_2$) após passagem por um filtro de 0,22 µm e outra via para exaustão dos gases com condensação da umidade (Figura 6B). Os sensores presentes para a medição de pH e do oxigênio dissolvido (OD, representado pela porcentagem de saturação do ar) foram previamente calibrados antes da inoculação celular. Para calibração do sensor de OD, o set spam (100%) foi fixado após estabilização da leitura com o volume de trabalho em 600 mL já com a presença dos MC, velocidade de agitação constante em 50 ou 70 rpm (a depender do experimento) e injeção de ar-comprimido em 100%. O valor do set zero (0%) foi calibrado eletronicamente com a desconexão do cabo do sensor até a leitura estabilizar em 0,0. O ajuste do set *point* dos parâmetros de temperatura, gases, pH, OD e agitação foi possível através da interface eletrônica do gabinete de controle do biorreator (Figura 6C).

Figura 6 – Biorreator BioFlo CelliGen 115 utilizado nos experimentos em larga escala com CEM-TAh (A). Em B é destacado o cabeçote da dorna com as vias de inoculação (In) e amostragem (Am), os sensores para pH e OD, além do filtro da entrada dos gases e o exaustor (Ex) para saída. Em C é apresentada a interface do gabinete de ajuste e acompanhamento dos parâmetros reguláveis.

A	B					Filtro	
	LoopName	PV	Setpoint	Out%	Mode	Units	Casc.
	Agit	50	50	21.1	Auto	RPM	None
	Temp	36.5	36.5	1.7	Auto	DegC	None
	pН	7.32	7.30	-2.9	Auto	pН	None
	DO	39.6	40.0	-0.7	Auto	%DO	None
	Air (1)	99.3	99.3	99.3	4 Gas	%	None
	O2 (2)	0.0	0.0	0.0	4 Gas	%	None
	N2 (3)	0.1	0.1	0.1	4 Gas	%	None
epender To a construction of the second se	CO2 (4)	0.6	0.6	0.6	4 Gas	%	None
	Summary	Calibratio	n 📸 Casc	ade 📐	Trend 👸	Pumps 💦	Setup

Fonte: acervo pessoal.

Pela interface eletrônica também foi possível acompanhar o histórico e o estado de cada parâmetro ao longo de todo o cultivo. Tais dados disponibilizados em planilha pelo equipamento foram utilizados para se observar o valor médio de cada parâmetro ao final da cultura comparativamente ao *set point* estabelecido (Tabela 6) e a possibilidade de correlacionar possíveis alterações no rendimento celular com flutuações nos valores de cada parâmetro.

O ajuste de pH foi feito pela injeção controlada de CO_2 realizada pelo algoritmo do equipamento quando o pH alcançava valores superiores ao fixado no *set point* (7,3 ± 0,02). A solução tampão básica foi removida do aparato ao se observar que a tendência do meio de cultura era de se tornar básico na ausência de CO_2 . Da mesma maneira, o sensor de nível não foi utilizado, visto que a aspersão de gases pelo cabeçote da dorna não ocasionou a formação de bolhas no meio de cultura em comparação ao método *overlay* (no interior do meio) e manteve a eficiência de controle do pH e OD, evitando maiores efeitos de cisalhamento.

A Tabela 6 apresenta os parâmetros operacionais fixos presentes em todos os cultivos em biorreator e também os parâmetros variáveis em função do experimento conduzido (B₁ a B₅). Os experimentos foram únicos e independentes, de forma que a cada experimento realizado algumas variáveis foram sendo ajustadas com base nos resultados apresentados a fim de se aperfeiçoar o protocolo de cultivo das CEM-TAh em biorreator. Todos os cultivos receberam o regime de adesão intermitente de 6 h de duração similar ao ministrado aos frascos *spinners*, com a diferença de que o volume total de trabalho (600 mL) esteve presente desde o início em função da calibração prévia do sensor de OD.

					Pa	arâmetros o	operacionais	fixos				
Тіро се	lular	V	olume de t	rabalho	Suplementação do meio de cultura		Temp do c	eratura Tipo e cultivo do mi		concentração rocarregador	Via de aeração	
CEM-TAh ou 3ª pas	em 2 ^a sagem	Me	600 m eio de cultu	lL ra αMEM	10% de SFB e 1% de Antibiótico-antimicótico		36	36,5° C Cultisr		oher-S (1 g/L)	Injeção pelo cabeçote	
				F	Parâmetros	operaciona	ais variáveis	(exceção a	ao pH)			
Sigla	Temp de c	oo total cultivo	Concen inócul	tração do lo inicial	Relação o microcar	células por regadores	Concentra oxigênio di	ação de ssolvido	рН		Velocidade	Regime de renovação do
•	Dias	Horas	Células/ mL	Células totais	Células/ MC	Células/ cm²	Set point	Média	Set point	de agitação Média		meio de cultura
B ₁	21	504	4,8 x 10 ⁴	2,88 x 10 ⁷	60:1	3.200	20%	19,98%	7,30	7,31	70 rpm	25% cada 72 hrs
B ₂	21	504	2,4 x 10 ⁴	1,44 x 10 ⁷	30:1	1.600	2%	2,13%	7,30	7,31	70 rpm	25% cada 72 hrs
B ₃	21	504	2,4 x 10 ⁴	1,44 x 10 ⁷	30:1	1.600	20%	19,99%	7,30	7,31	50 rpm	25% cada 72 hrs
B_4	9	216	1,2 x 10 ⁴	7,20 x 10 ⁶	15:1	800	20 até 40%	28,03%	7,30	7,32	50 rpm	25% cada 72 hrs
B ₅	9	216	1,2 x 10 ⁴	7,20 x 10 ⁶	15:1	800	20 até 40%	29,79%	7,30	7,39	50 rpm	25% cada 48 hrs

 Tabela 6 – Apresentação dos parâmetros fixos e variáveis avaliados em cada experimento único conduzido no biorreator.

3.9 Análise cinética da proliferação celular

Os experimentos de avaliação proliferativa em cultura estática ou em suspensão foram submetidos a analise cinética conforme apresentado abaixo:

A taxa de crescimento específica (μ_x) foi determinada pela Equação 6, em que *X* representa a concentração celular obtida pela contagem em câmara de Neubauer, e *dX/dt*, a taxa de proliferação no sistema de cultivo.

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{dX}{dt}$$
 (Equação 6)

A taxa de crescimento específica máxima (μ_{max}), avaliada na fase de crescimento logarítmico, onde o valor é constante, foi determinada a partir de uma regressão linear entre o logaritmo natural das concentrações celulares (ln[células/cm²]) e o tempo de cultivo (AUGUSTO et al., 2010). O valor de μ_{max} foi obtido por meio do coeficiente angular da equação da reta nesta região da curva. O coeficiente também foi utilizado na determinação do tempo de duplicação t_d (ou tempo de geração) (Equação 7).

$$t_d = rac{\ln 2}{\mu_{max}}$$
 (Equação 7)

A produtividade celular máxima (Π), dada pela Equação 8, expressa uma relação entre a taxa de produção de células do instante inicial (X_i) ao ponto que apresenta a concentração celular máxima (X_{max}) e o intervalo de tempo de cultivo necessário para atingir a quantidade estipulada ($\Delta t_{ti} \rightarrow tmax$):

$$\Pi = \frac{X_{max} - X_i}{\Delta t_{t_i \to t_{max}}}$$
(Equação 8)

O fator de proliferação (Fp) (CARUSO et al., 2014) expressa quanto o cultivo proliferou comparativamente a quantidade de células aderidas presentes após 24 h de cultura (*Ni*). Pode ser calculado em cada dia do cultivo com base na quantidade de células quantificadas por mL ou em células totais, dado na Equação 9 por *Nf*.

$$\mathbf{F}\mathbf{p} = \frac{Nf}{Ni}$$
(Equação 9)

3.10 Análise de coloração fluorescente para a densidade celular em MC

Para acompanhar a evolução da densidade das CEM-TAh aderidas sobre os MC das culturas em biorreator, foi utilizado o método de visualização através do corante fluorescente DAPI (300 nM) (dicloridrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol, D1306 – Invitrogen, Carlsbad, EUA) que tem afinidade de ligação com o DNA. A técnica foi empregada em momentos específicos da cultura (24, 168, 336 e 504 h para os cultivos B₁ a B₃ e 24, 120 e 216 h para os cultivos B₄ e B₅). Para isso, foram amostrados 1 mL do meio de cultura sob agitação, em seguida, após a decantação dos MC o meio foi removido e os MC lavados 1x com PBS. Após nova decantação e remoção do PBS, foi adicionado 300 µL da solução de DAPI por 10 m, em seguida a solução foi descartada e os MC lavados 2x com PBS antes de a visualização ser efetuada em microscópio de fluorescência Zeiss (Oberkochen, Alemanha) modelo Scope A1-Axio, com sistema de captura de vídeo AxioCam ICc3, de 3.0 mega pixel, acoplada ao sistema digitalizador de imagens Axio Vision, versão 4.7.2 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) utilizando o filtro ultravioleta (excitação do DAPI: 372 nm; emissão: 456 nm).

3.11 Análise de mensuração dos agregados de microcarregadores

A partir das amostras recolhidas as 24, 168, 336 e 504 h para os cultivos B₁ a B₃ e 24, 120 e 216 h para os cultivos B₄ e B₅ para realização da coloração fluorescente de análise da densidade celular (sessão 3.10) e viabilidade das células aderentes (sessão 3.15), também foi realizado a mensuração do perímetro (μ m) dos microcarregadores agregados presentes nas amostras. Um total de 20 a 50 agregados de MC formados pelas CEM-TAh aderidas foi mensurado para cada amostra através do software *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) a partir das fotomicrografias capturadas pelo sistema digitalizador de imagens do microscópio de fluorescência conforme descrito na sessão 3.10.

3.12 Análise da espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A determinação dos compostos presentes nas alíquotas de meio de cultura recolhidas ao longo das 192 h dos cultivos nos experimentos em cultura estática (Apêndice A) ocorreu pela varredura espectral através de um analisador de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (Bruker Optics, Bruker Tensor 27, Billerica, EUA). Para a análise, 500 µL do meio de cultura centrifugado foram distribuídos em um substrato de Germânio para evaporação da água presente antes da realização das medidas. Os espectros FT-IR foram coletados em triplicata na faixa espectral de 400-4000 cm⁻¹. As medidas foram obtidas com 128 *scans* e resolução espectral de 4 cm⁻¹. Um único espectro do meio de cultura antes de inocular cada situação experimental foi realizado para ser utilizado como controle (AROCA, 2006; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2009).

3.13 Análise bioquímica dos nutrientes e metabólitos

A concentração dos nutrientes e metabólitos presentes ao longo do cultivo dos experimentos em cultura estática foi realizada em triplicata com a coleta de 1 mL de meio de cultura, seguido de centrifugação a 750 G por 4 m. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em uma unidade com diâmetro de poro de 0,22 µm e congeladas a -20° C até a execução das análises bioquímicas de nutrientes ou metabolitos. As concentrações de glicose, lactato, glutamina e glutamato (mM) foram determinadas em duplicata utilizando um analisador bioquímico que tem como principio o uso de reações enzimáticas acopladas a um detector eletroquímico [YSI 2700 – Select Bioanalyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, EUA)] (NÚNEZ et al., 2014). O mesmo regime de amostragem adotado para a análise FT-IR foi aplicado para a mensuração bioquímica no YSI (a cada 24 h).

3.14 Análise da viabilidade celular pelo método colorimétrico

Foi utilizado o MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) como um método colorimétrico para determinação da viabilidade celular de amostras das culturas em suspensão em biorreator (B₁ a B₅), comparando-se o início (pós-tripsinização para inoculação – 0 h), com o final do cultivo (com as células ainda aderidas aos MC). Para a reação, 1,0 x 10^4 células foram adicionadas a cada um de um total de 10 poços (0,84 cm² por poço) de uma placa de 48 poços. Após 4 h de incubação em estufa de CO₂ a 36,5° C, o volume de meio de cultura presente em cada poço foi reduzido para 200 µL e iniciou-se o procedimento com o Vybrant[®] MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA), em que 20 µL da solução diluída de MTT (5 mg/mL) foram homogeneizados com os 200 µL de cada amostra e

incubados em estufa de CO₂ a 36,5° C por 4 h. Após o período de reação, 50 μ L da solução foram removidos de cada poço e em seguida foram adicionados 100 μ L de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan de cor roxa. Após a homogeneização, a placa foi novamente incubada em estufa de CO₂ por 10 m, procedendo-se em seguida para a coleta do sobrenadante e a transferência de cada amostra para uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (Multiskan FC Versão 1.0079 – Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) no comprimento de onda de 560 nm. O controle (branco) foi realizado para cada teste pela adição do MTT ao meio de cultura de um poço ausente de células.

3.15 Análise de coloração fluorescente para a viabilidade celular em MC

O acompanhamento da viabilidade celular das CEM-TAh ao longo do cultivo em biorreator foi realizado através da coloração fluorescente com Laranja de Acridina (3,6-dimetillaminoacridina) combinada com Brometo de Etídeo (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio) (LA/BE). A combinação dos corantes permite a visualização da viabilidade celular em diferentes estágios: células viáveis apresentam a coloração verde (Figura 7A); células em apoptose a coloração laranja (Figura 7B) e células em necrose a coloração vermelha (Figura 7C). Além disso, a coloração reage com os lisossomos que também ficam corados em vermelho (Figura 7A).

Figura 7 – Demonstração dos diferentes estágios de viabilidade celular das CEM-TAh identificados pela coloração fluorescente com laranja de acridina e brometo de etídeo. Setas exemplificam células viáveis (A), em apoptose (B) e em necrose (C). Em A também é dado destaque a coloração vermelha apresentada pelos lisossomos (cabeça de seta). Barras: 50 µm.



Fonte: acervo pessoal.

A técnica foi empregada as 24, 168, 336 e 504 h para os cultivos B_1 a B_3 e 24, 120 e 216 h para os cultivos B_4 e B_5 . Para isso, foram amostrados 1 mL do meio

de cultura sob agitação, em seguida, após a decantação dos MC o meio foi removido e os MC lavados 1x com PBS. Após nova decantação e remoção do PBS, foi adicionado 300 µL da solução de LA/BE (50 µg/mL) por 5 m. Após este período a solução foi descartada e os MC foram cuidadosamente lavados 2x com PBS antes de a visualização ser efetuada em microscópio de fluorescência (descrito na sessão 3.10) utilizando o filtro azul para o laranja de acridina (excitação: 490 nm; emissão: 530 e 640 nm) e o filtro verde para o brometo de etídeo (excitação: 545 nm; emissão: 605 nm). As fotomicrografias realizadas para ambos os corantes foram combinadas através do software *ImageJ*.

3.16 Análise do ensaio cometa

Para monitorar in vitro o grau de fragmentação do DNA das CEM-TAh ao longo de cada cultivo realizado em biorreator, o ensaio cometa alcalino foi realizado conforme procedimento descrito por Fuchs e colaboradores (2012). Para isso, foram homogeneizados 100 µL da suspensão celular proveniente da digestão dos MC presentes em 2 mL da alíquota de meio de cultura recolhida sob agitação, com 75 µL de agarose LMP (Low Melting Point) 0,5% a 37°C que foram dispostas sobre as lâminas pré-gelatinizadas com agarose NMP (Normal Melting Point). Foram preparadas duas lâminas para cada amostra. As amostras foram recolhidas a cada 72 h de cultivo, ou seja, as 72, 144, 216, 288, 360, 432 e 504 h dos experimentos B₁ a B₃ e até as 216 h para os cultivos B₄ e B₅. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas em geladeira por 15 m para solidificação. Em seguida, foram submetidas a solução de lise à 4°C, por 2 h. Após a lise, as lâminas foram colocadas em solução tampão (NaOH) (pH>13) por 20 m e submetidas à eletroforese a 20 V, 300 mA, por 30 m. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹ por 10 m, fixadas em etanol absoluto por 10 m e coradas com brometo de etídeo (0,02 mol L⁻¹). Um total de 200 nucleoides aleatoriamente selecionados foi analisado, sendo 100 para cada lâmina. Os nucleoides foram analisados em microscópio de fluorescência (descrito na sessão 3.10), na objetiva de 40x, utilizando o filtro verde devido a coloração com brometo de etídeo (excitação: 545 nm; emissão: 605 nm).

Os danos no DNA foram qualitativamente classificados de acordo com a área danosa: classe 0 (células sem dano) (Figura 8A), classe 1 (células ligeiramente danificadas) (Figura 8B), classe 2 (dano intermediário) (Figura 8C), classe 3 (as

células apresentam uma área de dano com tamanho equivalente a duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça) (Figura 8D), classe 4 (pode não se observar a cabeça do cometa, ou quando presente a área de dano/cauda é de três vezes ou mais o diâmetro da cabeça) (Figura 8E-F).

Figura 8 – Representação das classes de dano das CEM-TAh avaliadas pelo ensaio cometa ao longo dos cultivos em biorreator. As setas indicam células com dano classe 0 (A), classe 1 (B), classe 2 (C), classe 3 (D) e classe 4 (E e F). Barras: 50 μ m (C); 100 μ m (A, B, D, E e F).



Fonte: acervo pessoal.

Também foi realizado o cálculo da Unidade Arbitrária para obtenção do Índice de dano (*score*) para cada lâmina, sendo 0 (sem dano) a 400 (dano máximo) (Equação 10):

$$UA = (N0 \times 0) + (N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)$$
 (Equação 10)

Onde, UA (Unidade Arbitrária representando o *score* de dano da amostra); N0 a N4 (nucleoides nas classes 0, 1, 2, 3 e 4).

Cada ensaio cometa contou com lâminas em duplicata para o controle positivo, onde a amostra foi tratada com o agente tóxico ciclofosfamida (50 µg/mL) (C0768-1G – Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) por 15 m antes da deposição das células sobre as lâminas, e o controle negativo, apenas com células em 2^a ou 3^a passagem recém tripsinizadas da cultura estática para o inóculo inicial do cultivo.

3.17 Análise de detecção da β-Galactosidase nas CEM-TAh

Para avaliar a possível senescência das células cultivadas em biorreator (experimentos $B_4 \in B_5$) foi utilizado o Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, Danvers, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, foram obtidas amostras celulares pré-inoculação ao biorreator que foram comparadas em duplicata com amostras do final de cada cultivo em suspensão (216 h). As células foram dispostas sobre lamínulas estéreis de 20 x 20 mm no interior de poços de placas de 6 poços para adesão. No dia seguinte, foi descartado o meio de cultura e os poços lavados 1x com PBS, seguido de fixação por 15 m com a solução fixadora presente no kit. Após a fixação, os poços foram lavados 1x com PBS e 1 mL da solução de coloração para a β-Galactosidase em pH 6,0 foi adicionada a cada poço e mantidos em incubação em estufa a 37° C ausente de CO₂ para manutenção do pH da solução. Após um período overnight em estufa, as lamínulas foram removidas dos poços e deixadas secar em temperatura ambiente até a montagem em lâmina histológica com Entelan para análise em microscópio óptico de luz (Olympus CX31, Tóquio, Japão). A atividade da β-Galactosidase (uma enzima indicadora de senescência celular) foi confirmada pela visualização da frequência e intensidade da coloração azulada presente ou não no citoplasma das células fixadas.

3.18 Análise do micronúcleo

Para investigar a presença de danos genotóxicos nas CEM-TAh cultivadas em biorreator, foi realizado o teste de micronúcleo adaptado do protocolo descrito por Fenech (2000). Para isso foram obtidas amostras de células tripsinizadas dos MC ao final (216 h) dos experimentos B₄ e B₅ em biorreator. As células foram depositadas em quadruplicata para a adesão sobre lamínulas estéreis de 20 x 20 mm alocadas no interior dos poços das placas de 6 poços e mantidas em estufa de CO₂ a 36,5° C por 24 h. Em seguida, foi adicionado citocalasina B (3 µg/mL) (C6762-1MG - Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) ao meio de cultura de cada poco que foi mantido por 96 horas a fim de abranger o tempo de duplicação celular e fornecer uma maior quantidade de células binucleadas. Após este período, o meio de cultura foi removido e os poços lavados 1x com PBS, seguido de 10 m em solução hipotônica gelada de KCI 75 mM e fixação por 30 m com metanol puro. Após a fixação, cada poço com lamínula foi lavado 1x com PBS seguido da adição de 300 µL do corante fluorescente DAPI (300 nM) diluído em 1 mL de PBS para ação por 10 m em ambiente protegido da luz. A solução foi descartada e o poço lavado 1x com PBS, seguido de remoção da lamínula que foi transferida para uma lâmina histológica contendo uma gota de PBS suficiente para manter aderida e úmida a lamínula invertida. A lâmina foi analisada em microscópio de fluorescência (como descrito na sessão 3.10) para visualização das células binucleadas (Figura 9) em objetiva de 40x. Em cada lamínula, 500 células foram analisadas aleatoriamente para determinação do Índice de Divisão Nuclear – IDN (Equação 11) e 500 células binucleadas para contagem de micronúcleos (Figura 9B e 9D), totalizando 2000 células pra cada análise em cada cultura.

$$IDN = \frac{[M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)]}{N}$$
 (Equação 11)

Onde, M1 a M4 é o número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos e N é o número total de células analisadas por lamínula (= 500).

Cada teste do micronúcleo contou com amostras de CEM-TAh em quadruplicata para realização do controle positivo (C+), cujas células foram tratadas com o agente tóxico mitomicina C (0,5 µg/mL de meio) (M4287-2MG – Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) por 24 h antes do bloqueio da citocinese por 96 h com a citocalasina B, e o controle negativo (C-0 h), que se diferenciou por ser isento

de tratamentos e composto por células do respectivo inóculo inicial de cada experimento em biorreator (B₄ e B₅) que foram provenientes da proliferação anterior em cultura estática.

Figura 9 – Exemplo de CEM-TAh binucleadas (setas) após o bloqueio da citocinese por 96 h com a citocalasina B com a ausência (A e C) ou presença (B e D) de micronúcleos (cabeça de seta). A-D, células coradas com o corante fluorescente DAPI. Barras: 10 μ m (B e D); 20 μ m (A e C).



Fonte: acervo pessoal.

3.19 Análise imunofenotípica

Ao final do cultivo dos experimentos em cultura estática com diferentes volumes de meio de cultura e dos experimentos S_{15} e S_{16} em frasco *spinner* e B_5 em biorreator, foram obtidos de cada caso uma alíquota de 4 x 10^6 CEM-TAh para análise em citometria de fluxo (FACS Calibur-Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) usando os anticorpos anti-CD34 (555822), anti-CD45 (555483), anti-CD73 (561254), anti-CD90 (555595) e o antígeno leucocitário humano (HLA)-DR (347364) (Becton Dickinson Pharmigen, Franklin Lakes, EUA). As células foram incubadas com os

anticorpos monoclonais seguindo recomendação do protocolo do fabricante. Controles de isótopos também foram preparados para cada experimento. Foram analisados pelo menos 10.000 eventos para cada amostra. Para a aquisição e análise dos dados foram utilizados os softwares *Cell Quest* e *Paint a Gate* (Becton Dickinson Pharmigen, Franklin Lakes, EUA).

3.20 Análise de diferenciação in vitro

Para análise do potencial de diferenciação das CEM-TAh nas linhagens mesodérmicas *in vitro*, as células, provenientes da dissociação ao final dos experimentos em cultura estática com diferentes volumes de meio de cultura e dos experimentos $S_{15} e S_{16}$ em frasco *spinner* e $B_1 a B_5$ em biorreator, foram plaqueadas em placas de 6 poços seguindo o protocolo específico dos kits de diferenciação condrogênica (A10071-01), osteogênica (A10072-01) e adipogênica (A10070-01) (StemPro de Gibco, Nova York, EUA). A exceção foi o teste de diferenciação condrogênica que não foi aplicado aos experimentos da cultura em suspensão. As células foram mantidas em cultivo durante o período recomendado pelo fabricante e as diferenciações foram confirmadas por análise da coloração com Alcian Blue (condrogênica), Alizarin Red S (osteogênica) e Oil Red O (adipogênica). Imagens da cultura celular foram capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio óptico de luz invertido (Tucsen, Gaishanzhen, China) com o uso do programa *ISCapture Professional Imaging Software* (Tucsen, Gaishanzhen, China).

Controles para a diferenciação celular foram cultivados e corados nas mesmas condições e sujeitos à mesma rotina de troca de meio que os experimentais, com a exceção de que as células foram cultivadas somente com meio de cultura suplementado.

3.21 Análise estatística

A organização dos dados primários foi feito no programa Microsoft Excel 2007. A elaboração dos histogramas, curvas de proliferação, bem como os ajustes lineares dos dados e obtenção dos respectivos coeficientes, e testes estatísticos de comparação de alternativas foram executados no software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, EUA). De acordo com as características de cada variável, os dados foram analisados por meio da análise paramétrica de variância

(ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, em caso de não homocedasticidade dos dados revelado pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Da mesma forma, para a comparação entre duas amostras independentes seguiu-se com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todos os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão (SEM) e foi considerado o nível de significância (α) inferior a 0,05.

3.22 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP e registrado pela Plataforma Brasil (CAAE: 58107716.0.0000.5401). Além disso, o experimento foi conduzido de acordo com os parâmetros legais, definidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde. Os doadores de tecido adiposo foram cientes quanto à doação e a finalidade da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A).

4 RESULTADOS

4.1 Cultura das CEM-TAh em frascos-T

Os resultados referentes aos experimentos de cultura estática em frascos-T de 25 cm² sobre a cinética de proliferação das CEM-TAh em diferentes volumes de meio de cultura, correlacionada com as concentrações de nutrientes e metabólitos, estão apresentados no artigo publicado de Simão e colaboradores (2019) disponibilizado de forma integral no Apêndice A deste documento.

Resumidamente, a proliferação das CEM-TAh foi similar (p>0,05) entre os cultivos em frascos-T com 5, 10 ou 15 mL de meio ao longo das 192 h de cultura (Figuras 1 e 2, Anexo A). No entanto, a concentração de nutrientes e metabólitos variou significativamente (p<0,05) entre os grupos em função do volume de meio e do tempo em cultura (Tabela 2, Anexo A). Apesar da menor concentração de glicose e glutamina, e da maior concentração de lactato e glutamato presentes no decorrer da situação com 5 mL de meio, os níveis não alcançaram valores limitantes para a proliferação das CEM-TAh (Tabela 2, Anexo A) ou modificaram o espectro de componentes presentes no meio de cultura avaliado pela FT-IR (Figura 3, Anexo A).

4.2 Cultura das CEM-TAh em frasco spinner

4.4.1. Fase de inoculação

4.4.1.1 Definição do regime e velocidade de agitação

Com o objetivo de definir o regime de agitação (intermitente ou contínuo) de 6 h que combinado com diferentes velocidades (70 ou 100 rpm), conferisse a maior eficiência de adesão e viabilidade das CEM-TAh nas 24 h iniciais do cultivo, foram desenvolvidos os experimentos S_1 a S_4 em frasco *spinner* (Tabelas 5 e 7).

Sigla	Inóculo inicial (células/MC/mL)	SFB	Regime de adesão	Velocidade de agitação (6 a 24 h)
S ₁	9:1 (7,2 x 10 ³ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	70 rpm
S ₂	9:1 (7,2 x 10 ³ p/mL)	10%	Intermitente com 100 rpm	100 rpm
S ₃	9:1 (7,2 x 10 ³ p/mL)	10%	Contínua com 70 rpm	70 rpm
S ₄	9:1 (7,2 x 10 ³ p/mL)	10%	Contínua com 100 rpm	100 rpm

Tabela 7 – Descrição dos experimentos S₁ a S₄ em frasco spinner.

A Tabela 8 e a Figura 10 apresentam os resultados para cada situação. A porcentagem de células aderidas aos MC esteve muito baixa as 4 h de cultivo, e aumentou gradativamente até as 24 h. Ao final deste período a situação S₁ (intermitente com 70 rpm), foi a que apresentou a maior porcentagem de células aderidas (56%), porém de forma similar (p>0,05) as situações S₃ (intermitente com 100 rpm) e S₄ (contínua com 100 rpm), e superior (p<0,05) apenas ao cultivo S₂ (contínua com 70 rpm). Conforme observado na Figura 10 e na Tabela 8, nas situações S₂, S₃ e S₄, houve uma queda na adesão celular em algum período da cultura em agitação na comparação com a eficiência de adesão apresentada em contagens anteriores. Dessa maneira, o S₁ apresentava uma eficiência de adesão celular superior (p<0,05) ao S₂ e S₃ às 8 h de cultivo, e ao S₃ e S₄ as 12 h, apesar de ter estado com a menor porcentagem de adesão às 4 h (Tabela 8).

Tamma da audúina	Eficiência de adesão (%)								
Tempo de cultivo	S ₁ - Intermitente (70 rpm)	S ₂ - Intermitente (100 rpm)	S₃ – Contínua (70 rpm)	S ₄ - Contínua (100 rpm)					
4 h	23,2 ± 3,2 a	30,3 ± 2,1 b	24,7 ± 2,3 a	24,6 ± 2,2 ab					
8 h	42,9 ± 2,8 a	27,2 ± 3,5 b	15,4 ± 1,7 b	35,4 ± 2,9 a					
12 h	42,9 ± 2,5 a	44,0 ± 3,3 a	23,6 ± 2,5 b	28,8 ± 1,8 b					
24 h	56,1 ± 3,1 a	30,0 ± 3,2 b	47,1 ± 3,3 a	48,0 ± 4,0 a					
	Viabilidade das células aderentes (%)								
Tompo do cultivo	Viat	oilidade das cél	ulas aderente	s (%)					
Tempo de cultivo	Viak S ₁ - Intermitente (70 rpm)	bilidade das cél S ₂ - Intermitente (70 rpm)	ulas aderente S ₃ – Contínua (70 rpm)	S (%) S ₄ - Contínua (100 rpm)					
Tempo de cultivo 4 h	Viak S ₁ - Intermitente (70 rpm) 95,2 ± 1,4 a	S ₂ - Intermitente (70 rpm) 72,5 ± 2,9 b	Ulas aderente S ₃ – Contínua (70 rpm) 97,3 ± 0,9 a	s (%) S ₄ - Contínua (100 rpm) 57,1 ± 1,0 b					
Tempo de cultivo 4 h 8 h	Viak S_1 - Intermitente (70 rpm) 95,2 ± 1,4 a 91,5 ± 1,5 a	bilidade das cél S_2 - Intermitente (70 rpm) $72,5 \pm 2,9$ b $75,0 \pm 2,6$ b	Ulas aderente S ₃ – Contínua (70 rpm) 97,3 ± 0,9 a 97,3 ± 0,9 a	S (%) S ₄ - Contínua (100 rpm) 57,1 ± 1,0 b 77,3 ± 2,9 b					
Tempo de cultivo 4 h 8 h 12 h	Viak S_1 - Intermitente (70 rpm) 95,2 ± 1,4 a 91,5 ± 1,5 a 81,9 ± 1,9 a	bilidade das cél S_2 - Intermitente (70 rpm) $72,5 \pm 2,9$ b $75,0 \pm 2,6$ b $83,5 \pm 2,1$ a	ulas aderente S_3 – Contínua (70 rpm) 97,3 ± 0,9 a 97,3 ± 0,9 a 83,2 ± 2,9 a	s (%) S ₄ - Contínua (100 rpm) 57,1 ± 1,0 b 77,3 ± 2,9 b 76,4 ± 3,1 b					

Tabela 8 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aos MC durante as 24 h de cultivo em diferentes regimes de agitação e velocidade nos experimentos S_1 a S_4 em frasco *spinner*.

Experimentos em duplicata. Valores em média ± erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn. Na mesma linha, valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

Com relação à viabilidade celular, os cultivos $S_1 e S_3$ apresentaram no início (4 e 8 h) uma elevada viabilidade das células aderidas comparativamente às situações $S_2 e S_4$ (p<0,05), e uma redução para valores próximos a 80% a partir das 12 h em cultura, enquanto isso nas situações $S_2 e S_4$ a viabilidade começou baixa

mas aumentou gradativamente, com o S₂ apresentando 100% de viabilidade para seus 30% de células aderidas presentes no cultivo (Tabela 8; Figura 10).

Figura 10 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aos MC ao longo das 24 h de cultivo nas situações experimentais S_1 a S_4 em frasco *spinner*.



Valores da viabilidade e de adesão celular em média (%) ± erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn.

Considerando o desempenho geral dos cultivos até aqui quanto a eficiência de adesão e viabilidade das células aderidas, o design experimental do S₁ (regime de agitação intermitente nas primeiras 6 h de cultivo a 70 rpm), ficou definido para os próximos experimentos desenvolvidos em frasco *spinner*.

4.4.1.2 Definição da concentração do inóculo inicial

Após a definição do S₁ como a situação com o melhor regime de adesão para as 24 h iniciais do cultivo em frasco *spinner*, objetivou-se definir a concentração de inóculo inicial que concilie a melhor eficiência de adesão e viabilidade celular (Tabelas 5 e 9). Sendo assim, foram desenvolvidos os spinners S₅ (1600 células/cm², equivalente a 30 células/MC) e S₆ (3200 células/cm², 60 células/MC) que foram comparados entre si, juntamente da situação S₁ com 480 células/cm² (9 células/MC).

Sigla	Inóculo inicial (células/MC/mL)	SFB	Regime de adesão	Velocidade de agitação (6 a 24 h)
S ₁	9:1 (7,2 x 10 ³ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	70 rpm
S ₅	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	70 rpm
S ₆	60:1 (4,8 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	70 rpm

Tabela 9 – Descrição dos experimentos S₁, S₅ e S₆ em frasco spinner.

Conforme se apresenta na Tabela 10 e Figura 11, a situação S₆ foi a de pior desempenho. Ao final das 24 h de cultivo, o S₆ apresentou uma menor (p<0,05) porcentagem de células em adesão comparativamente ao S₁. O S₅ obteve uma eficiência de adesão intermediária (p>0,05) entre as duas situações. Apesar do S₅ ter iniciado o cultivo com uma porcentagem de células aderidas superior ao S₁ (p<0,05 as 4 h), isso não refletiu numa porcentagem maior de células aderidas após as 24 h de cultura (p>0,05). No entanto, quando observado a viabilidade celular, os cultivos S₅ e S₆ encerraram a cultura de 24 h com uma viabilidade superior (p<0,05) ao S₁ (Tabela 10; Figura 11). Em função disso, pela melhor viabilidade celular em comparação ao S₁ e a similaridade (p>0,05) quanto à adesão celular, a situação S₅ com 2,4 x 10⁴ células/mL (30:1) ficou definida para os próximos experimentos em frasco *spinner*.





Valores da viabilidade e de adesão celular em média (%) ± erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn.
	Eficiência de adesão (%)					
Tempo de cultivo	S ₁ - 9:1 (7,2 x 10 ³ p/mL)	S₅ - 30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	S ₆ - 60:1 (4,8 x 10 ⁴ p/mL)			
4 h	23,2 ± 3,2 a	36,8 ± 2,4 b	29,4 ± 1,6 ab			
8 h	42,9 ± 2,8 a	44,0 ± 3,0 a	42,8 ± 1,5 a			
12 h	42,9 ± 2,5 a	47,1 ± 2,6 a	43,4 ± 1,8 a			
24 h	56,1 ± 3,1 a	47,4 ± 2,6 ab	38,6 ± 2,3 b			
	Viabilidade das células aderentes (%)					
l'empo de cultivo	S ₁ - 9:1 (7,2 x 10 ³ p/mL)	S ₅ - 30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	S ₆ - 60:1 (4,8 x 10 ⁴ p/mL)			
4 h	95,2 ± 1,4 a	97,2 ± 0,7 a	94,7 ± 1,0 a			
8 h	91,5 ± 1,5 a	94,3 ± 1,2 a	91,9 ± 1,1 a			
12 h	81,9 ± 1,9 a	85,0 ± 1,2 a	90,5 ± 1,1 b			
24 h	79,8 ± 1,8 a	95,7 ± 0,8 b	95,4 ± 0,8 b			

Tabela 10 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aos MC durante as 24 h de cultivo em diferentes concentrações de inóculo inicial nos experimentos S_1 , S_5 e S_6 em frasco *spinner*.

Experimentos em duplicata. Valores em média ± erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn. Na mesma linha, valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

4.4.1.3 Definição da concentração de SFB

Com a definição da concentração do inóculo inicial em $30:1 (2,4 \times 10^4 \text{ células/mL})$ da situação S₅, procedeu-se com a avaliação da possível interferência da concentração do soro fetal bovino do meio de cultura suplementado na eficiência de adesão celular nas 24 h iniciais de cultivo (fase de inoculação). Tendo em vista que a concentração de SFB foi de 10% para todos os *spinners* até aqui, os novos experimentos avaliaram os efeitos da ausência (0%) de SFB (S₇) e de sua concentração a 20% (S₈) (Tabelas 5 e 11).

Tabela 11 – Descrição dos experimentos S₅, S₇ e S₈ em frasco spinner.

Sigla	Inóculo inicial (células/MC/mL)	SFB	Regime de adesão	Velocidade de agitação (6 a 24 h)
S ₅	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	70 rpm
S 7	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	0%	Intermitente com 70 rpm	70 rpm
S ₈	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	20%	Intermitente com 70 rpm	70 rpm

Como observado na Tabela 12 e Figura 12, as novas concentrações de SFB (0 e 20%) conferiram maior (p<0,05) eficiência de adesão as CEM-TAh em 4 h de cultivo na comparação com o S₅ contendo 10% do suplemento. A ausência de SFB (S₇) foi inclusive superior (p<0,05) a concentração de 20% (S₈), neste mesmo período avaliado e após as 8 h de cultivo (Tabela 12). No entanto, a ausência de SFB e sua concentração a 20% não foram eficientes em manter as células aderidas com o passar do tempo no cultivo em agitação (Figura 12), e com isso o S₅ obteve uma eficiência de adesão superior (p<0,05) ao final das 24 h (Tabela 12).

Quanto à viabilidade celular, ela foi similar (p>0,05) entre as diferentes situações ao longo do cultivo, a exceção ocorreu no período avaliado das 12 h em que todos diferiram entre si (p<0,05), variando entre 85 a 97% (Tabela 12; Figura 12). Pela queda acentuada na adesão celular das condições de 0 e 20% de SFB, a concentração de 10% do S₅ ficou definida para a fase de inoculação e para os próximos experimentos em frasco *spinner* a seguir.

Tempo de cultivo	Eficiência de adesão (%)					
	S₅ - 10% SFB	S ₇ - 0% SFB	S ₈ - 20% SFB			
4 h	36,8 ± 2,4 a	61,2 ± 1,6 b	47,7 ± 1,9 c			
8 h	44,0 ± 3,0 a	59,3 ± 2,4 b	51,0 ± 2,0 a			
12 h	47,1 ± 2,6 a	49,1 ± 2,8 a	43,1 ± 2,0 a			
24 h	47,4 ± 2,6 a	33,4 ± 2,6 b	27,3 ± 1,7 b			
	Viabilidade das células aderentes (%)					
Tempo de cultivo	Viabilidad	de das células ader	entes (%)			
Tempo de cultivo	Viabilidad S ₅ - 10% SFB	de das células ader S ₇ - 0% SFB	entes (%) S ₈ - 20% SFB			
Tempo de cultivo 4 h	Viabilidad S ₅ - 10% SFB 97,2 ± 0,7 a	de das células ader S ₇ - 0% SFB 94,8 ± 0,7 a	entes (%) S ₈ - 20% SFB 95,3 ± 0,7 a			
Tempo de cultivo 4 h 8 h	Viabilidad S ₅ - 10% SFB 97,2 ± 0,7 a 94,3 ± 1,2 a	S 7 - 0% SFB 94,8 ± 0,7 a 95,9 ± 0,9 a	entes (%) S ₈ - 20% SFB 95,3 ± 0,7 a 95,1 ± 0,9 a			
Tempo de cultivo 4 h 8 h 12 h	Viabilidad S ₅ - 10% SFB 97,2 ± 0,7 a 94,3 ± 1,2 a 85,0 ± 1,2 a	be das células ader S ₇ - 0% SFB 94,8 ± 0,7 a 95,9 ± 0,9 a 97,3 ± 0,6 b	entes (%) S ₈ - 20% SFB 95,3 ± 0,7 a 95,1 ± 0,9 a 92,4 ± 0,9 c			

Tabela 12 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aos MC durante as 24 h de cultivo em diferentes concentrações de SFB nos experimentos S_5 , S_7 e S_8 em frasco *spinner*.

Experimentos em duplicata. Valores em média ± erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn. Na mesma linha, valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

Figura 12 – Eficiência de adesão (%) e viabilidade (%) das CEM-TAh aderentes aos MC ao longo das 24 h de cultivo nas situações experimentais S_5 , S_7 e S_8 em frasco *spinner*.



Valores da viabilidade e de adesão celular em média (%) ± erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn.

4.2.2 Fase proliferativa

4.2.2.1 Definição da velocidade de agitação

A partir da definição dos parâmetros para a maior eficiência de adesão e viabilidade celular do cultivo em frasco *spinner* para a fase de inoculação (24 h iniciais), objetivou-se avaliar no período da fase proliferativa os atributos que pudessem conferir ao final das 216 h de cultivo (9 dias), o maior rendimento celular conciliado a um alto grau de viabilidade. Dessa forma, foram avaliados primeiramente o efeito da velocidade de agitação de 50 (S₉) ou 70 rpm (S₁₀), ao longo do cultivo em frasco *spinner* de 125 mL (Tabelas 5 e 13).

Sigla	Inóculo inicial (células/MC/mL)	SFB	Regime de adesão	Regime de renovação de meio	Velocidade de agitação (6 a 216 h)
S ₉	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	25% c/ 72 h	50 rpm
S ₁₀	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	25% c/ 72 h	70 rpm

Tabela 13 – Descrição dos experimentos $S_9 e S_{10}$ em frasco spinner.

A Figura 13 apresenta a concentração de células por mL e a viabilidade das células aderentes dos cultivos S_9 (Figura 13A) e S_{10} (Figura 13B), acompanhado do fator de proliferação (Fp) comparativo de cada dia do cultivo entre os experimentos (Figura 13C). A partir de cada perfil de crescimento foram calculados os parâmetros cinéticos da fase exponencial apresentados na Tabela 14.

Ao final das 216 h em cultura o cultivo S_9 obteve a maior concentração de células/mL (8,1 x 10⁴) comparativamente ao S_{10} (7,1 x 10⁴). Apesar disso, foi a

situação S₁₀ (com 6,79) que apresentou um Fp estatisticamente superior (p<0,05) ao S₉ (com 5,44) ao final do cultivo (Figura 13C). Esta maior proliferação do S₁₀ as 216 h se deve a ocorrência tardia da fase exponencial no cultivo com 70 rpm de agitação (Tabela 14). No cultivo S₉ com agitação a 50 rpm, a faixa identificada de crescimento exponencial ocorreu já a partir das 48 h de cultura, até as 144 h, de forma que ao final do cultivo, as CEM-TAh já se encontravam na fase platô, ausente no S₁₀ (Tabela 14; Figura 13A-B). A maior rapidez do S₉ em alcançar e sustentar o crescimento exponencial resultou em fatores de proliferação superiores (p<0,05) ao S₁₀ as 72, 96, 144 e 168 h de cultivo (Figura 13C).

Como resultado, os parâmetros cinéticos avaliados para a situação S₉ foram melhores do que no cultivo S₁₀, tais como o menor tempo para duplicação celular (46,8 h contra 72,2 h) e a maior produtividade celular máxima (325,52 células/mL/h ante 217,59 células/mL/h) (Tabela 14). Quanto a viabilidade celular, ambos os cultivos S₉ e S₁₀ apresentaram uma viabilidade elevada (>95%) das CEM-TAh em 50 ou 70 rpm (Figura 13A-B), não havendo diferença (p>0,05) entre as situações experimentais ao longo do cultivo.

Derêmetree einétieee	Experimentos			
Parametros cinéticos	S ₉ - 50 rpm	S ₁₀ - 70 rpm		
Fase exponencial do cultivo	48 a 144 h	96 a 216 h		
R ² da fase exponencial	0.9850	0.8912		
Equação da reta exponencial	y = 0.0148x + 9.162	y = 0.0096x + 9.1537		
µ _{max} (taxa de crescimento específica máxima)	0.0148/h	0.0096/h		
Tempo de duplicação da fase exponencial	46.8 h	72.2 h		
Produtividade celular máxima	325.52 células/mL/h às 192 h de cultivo	217.59 células/mL/h às 216 h de cultivo		

Tabela 14 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos S_9 e S_{10} em frasco *spinner*.

Figura 13 – Perfil de crescimento em células/mL e viabilidade (%) das CEM-TAh nas situações experimentais S_9 (A) e S_{10} (B) em frasco *spinner*. Em C, comparação estatística do fator de proliferação ao longo de todo o cultivo.



Experimentos em duplicata. Em A e B, viabilidade (%) dada em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney (p>0,05). Em C, valores em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney. * Diferença estatística significativa (p bilateral <0,05).

Em função dos resultados apresentados, a velocidade de agitação contínua a 50 rpm durante a fase proliferativa (situação S₉), ficou definida para os experimentos em frasco *spinner* posteriores.

4.2.2.2 Definição do regime de renovação do meio de cultura

Estabelecida a velocidade de agitação de 50 rpm para a fase proliferativa dos experimentos em frasco *spinner*, procedeu-se com a avaliação do regime de renovação parcial do meio de cultura que fornecesse o melhor rendimento e viabilidade das CEM-TAh ao longo das 216 h de cultivo. Para isso, foram conduzidos os ensaios com 0, 25 e 50% de renovação do meio, nos intervalos de 48 ou 72 h a partir do 3º dia de cultivo (72 h), conforme apresentado nas Tabelas 5 e 15.

Sigla	Inóculo inicial (células/MC/mL)	SFB	Regime de adesão	Regime de renovação de meio	Velocidade de agitação (6 a 216 h)
S ₉	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	25% c/ 72 h*	50 rpm
S 11	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	0%	50 rpm
S ₁₂	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	25% c/ 48 h*	50 rpm
S ₁₃	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	50% c/ 48 h*	50 rpm
S ₁₄	30:1 (2,4 x 10 ⁴ p/mL)	10%	Intermitente com 70 rpm	50% c/ 72 h*	50 rpm

Tabela 15 – Descrição dos experimentos S₉ e S₁₁ a S₁₄ em frasco spinner.

*Renovação do meio de cultura no intervalo programado a partir das 72 h em cultivo.

A concentração das células por mL e a viabilidade das células aderentes são apresentadas na Figura 14 para os cultivos S₉, S₁₁, S₁₂, S₁₃ e S₁₄ (Figura 14A-E, respectivamente), juntamente do fator de proliferação comparativo entre as situações experimentais (Figura 14F). Os resultados dos cálculos cinéticos obtidos a partir do perfil de crescimento de cada cultivo são apresentados na Tabela 16.

Apesar do maior volume de meio renovado, o cultivo S_{13} somente apresentou um efeito benéfico do regime de renovação do meio de cultura na proliferação celular a partir das 120 h quando ocorreu a 2ª troca parcial de meio (Figura 14D). O crescimento exponencial perdurou até as 192 h de cultivo e foi responsável ao S_{13} pelos maiores Fp alcançados (até 10,5) dentre as situações experimentais, porém, diferindo (p<0,05) apenas do cultivo S_{12} as 192 h (Figura 14F). Além disso, conferiu ao S_{13} a maior µmax (0.0193/h) e o menor tempo para duplicação celular (35.9 h) (Tabela 16). Enquanto no S_{11} a proliferação celular foi a de menor produtividade (Tabela 16) (Figura 14B), os demais regimes de renovação (S_9 , S_{12} e S_{14}) apresentaram crescimento já a partir das 48 h (Figura 14A, 14C e 14E), com o cultivo S_{14} encerrando a cultura ainda em fase exponencial, com a maior concentração de células por mL (1,0 x 10⁵) e a maior produtividade celular máxima (354.17 células/mL/h) (Tabela 16). Os mais econômicos no regime de renovação de meio, $S_9 \in S_{12}$, apresentaram uma produtividade celular máxima superior ao S_{13} (Tabela 16) num menor tempo de cultivo, de forma que com 144 h o S_9 já obtinha uma concentração celular superior ao máximo obtido em todo o tempo de cultivo do S_{13} (Figura 14A e 14D). Quanto a viabilidade celular, os cultivos apresentaram leves oscilações, porém acima dos 90%, desta maneira foram similares (p>0,05) durante todo o período.

Figura 14 – Perfil de crescimento em células/mL e viabilidade (%) das CEM-TAh nas situações experimentais S₉ (A), S₁₁ (B), S₁₂ (C), S₁₃ (D) e S₁₄ (E) em frasco *spinner*. Em F, comparação estatística do fator de proliferação ao longo de cada cultivo. Setas pontilhadas indicam os momentos de renovação do meio de cultura.



Experimentos em duplicata. Em A-E, viabilidade (%) dada em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney (p>0,05). Em F, valores em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney. * Diferença estatística significativa (p bilateral <0,05) do fator de proliferação entre os cultivos S₁₁ e S₁₄ às 72 h de cultivo, e entre o S₁₂ e o S₁₃ às 192 h de cultivo.

Parâmetros			Experimentos		
cinéticos	S ₉ - 25% de renovação c/ 72 h	S ₁₁ - 0% de renovação do meio	S ₁₂ - 25% de renovação c/ 48 h	S ₁₃ - 50% de renovação c/ 48 h	S ₁₄ - 50% de renovação c/ 72 h
Faixa exponencial do cultivo	48 a 144 h	96 a 216 h	48 a 168 h	120 a 192 h	96 a 216 h
R ² da faixa exponencial	0.9850	0.8558	0.8110	0.8414	0.8100
Equação da reta exponencial	y = 0.0148x + 9.162	y = 0.0119x + 8.010	y = 0.0111x + 9.510	y = 0.0193x + 7.675	y = 0.0091x + 9.618
µ _{max} (taxa de crescimento específica máxima)	0.0148/h	0.0119/h	0.0111/h	0.0193/h	0.0091/h
Tempo de duplicação exponencial	46.8 h	58.2 h	62.4 h	35.9 h	76.1 h
Produtividade celular máxima	325.52 células/mL/h às 192 h de cultivo	86.80 células/mL/h às 216 h de cultivo	342.26 células/mL/h às 168 h de cultivo	248.70 células/mL/h às 192 h de cultivo	354.17 células/mL/h às 216 h de cultivo

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos S_9 , S_{11} , S_{12} , S_{13} e S_{14} em frasco spinner.

4.2.2.3 Comparação do protocolo de cultivo das CEM-TAh em frasco *spinner* entre dois doadores distintos

Apesar dos resultados mais vantajosos para o cultivo S_{13} durante o período de crescimento exponencial, o cultivo S_{14} acabou sendo definido como o regime de renovação do meio de cultura em frasco *spinner* pela maior produtividade celular alcançada e a maior concentração de células/mL ao final das 216 h, dessa maneira ficou estabelecido o seguinte protocolo para o cultivo de CEM-TAh em frasco *spinner*: concentração celular inicial de 30:1 (2,4 x 10⁴ células/mL), regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, 10% de SFB no meio de cultura com renovação de 50% do meio a cada 72 h e velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa. O protocolo estabelecido foi então comparado entre CEM-TAh provenientes de doadores distintos, ambas do sexo feminino e cultivadas em 4^a passagem, nomeadas como Doador A (S₁₅) e Doador B (S₁₆).

A Figura 15 exibe o perfil de crescimento acompanhado da viabilidade celular das CEM-TAh de cada doador ao longo das 216 h de cultivo, assim como o fator de proliferação (Fp) comparado estatisticamente entre as culturas (Figura 15C). A Tabela 17 apresenta os resultados da cinética de proliferação em função da fase exponencial e da concentração celular máxima para cada doador (S₁₅ e S₁₆) alcançada no decorrer do cultivo.

Ambos os cultivos apresentaram um perfil de crescimento similar com a fase exponencial determinada entre as 96 e 192 h de cultura (Figura 15A-B), no entanto, comparando-se o Fp entre os cultivos, ocorreu um valor superior (p<0,05) para o doador A as 120, 144, 192 e 216 h (Figura 15C), com um Fp máximo de 11 para o S₁₅ as 192 h e de 8,1 para o S₁₆ as 216 h, respectivamente 421.97 contra 287.03 células/mL/h de produtividade celular máxima para cada doador (Tabela 17). Apesar do maior Fp e da maior produtividade obtida pelo S₁₅, o menor tempo para duplicação celular foi do S₁₆ com 43 h durante a fase exponencial, ante os 46.1 do doador A (Tabela 17). A viabilidade das CEM-TAh provenientes de ambos os doadores foi próxima de 100% ao longo de todo o cultivo (Figura 15A-B) e não diferiram estatisticamente (p>0,05) entre si.

Figura 15 – Perfil de crescimento em células/mL e viabilidade (%) das CEM-TAh provenientes de diferentes doadores (S_{15} - Doador A e S_{16} - Doador B) em frasco *spinner*. Em C, comparação estatística do fator de proliferação ao longo de cada cultivo.



Experimentos em duplicata. Em A e B, viabilidade (%) dada em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney (p>0,05). Em C, valores em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney. * Diferença estatística significativa (p bilateral <0,05).

Parâmetros cinéticos	Experimentos			
r drametros offetioos	S ₁₅ - Doador A	S ₁₆ - Doador B		
Faixa exponencial do cultivo	96 a 192 h	96 a 192 h		
R ² da faixa exponencial	0.9364	0.9422		
Equação da reta exponencial	y = 0.01503x + 8.628	y = 0.01612x + 8.372		
µ _{max} (taxa de crescimento específica máxima)	0.01503/h	0.01612/h		
Tempo de duplicação da fase exponencial	46.1 h	43.0 h		
Produtividade celular máxima	421.87 células/mL/h às 192 h de cultivo	287.03 células/mL/h às 216 h de cultivo		

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos S_{15} e S_{16} em frasco *spinner*.

4.2.2.3.1 Caracterização dos marcadores de superfície

O resultado da caracterização imunofenotípica das CEM-TAh provenientes dos diferentes doadores (A e B) após as 216 h de cultivo são apresentados na Figura 16. Ambas as culturas (S_{15} e S_{16}) apresentaram percentual superior a 98% para a presença dos marcadores CD73 e CD90 e valor inferior a 1% para os marcadores HLA-DR, CD34 e CD45 (Figura 16), valores dentro do preconizado pela ISCT.

Figura 16 – Histogramas representativos da citometria de fluxo para a imunofenotipagem das CEM-TAh provenientes do Doador A (S_{15}) e do Doador B (S_{16}) após as 216 h de cultivo. A análise imunofenotípica apresentou reação positiva (>0,98%) para os marcadores CD73 e CD90 e negativa (<1%) para os marcadores HLA-DR, CD34 e CD45 para as células de ambos os cultivos.



4.2.2.3.2 Diferenciação in vitro

O potencial de diferenciação *in vitro* das CEM-TAh cultivadas sob o mesmo protocolo de cultura em frasco *spinner*, porém provenientes de doadores distintos é apresentado na Figura 17. A diferenciação adipogênica (Figura 17C e 17E) e osteogênica (Figura 17D e 17F) foi confirmada para ambas as culturas após o protocolo de diferenciação submetido as CEM-TAh recuperadas ao final das 216 h de cultivo. Uma parte destas células foi submetida à situação controle (cultivo ausente dos meios de diferenciação) e coradas com as colorações específicas, e não apresentaram reação positiva ou alterações morfológicas que caracterizassem uma diferenciação espontânea ou induzida pelo protocolo de cultura (Figura 17A-B).

Figura 17 - Diferenciação das CEM-TAh dos doadores A (S₁₅) e B (S₁₆) após 216 h de cultura em frasco *spinner*. São apresentados exemplares de Controles para a diferenciação adipogênica (A) e osteogênica (B) das células de cada situação póscultivo em frasco *spinner* que ficaram ausentes do meio de diferenciação. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela presença de vacúolos lipídicos no citoplasma das células, indicado pela coloração em vermelho com Oil Red O (C e E setas pretas). A diferenciação osteogênica foi verificada mediante coloração da matriz celular calcificada em vermelho com o uso de Alizarin Red S (D e F, setas brancas). Barras: 50 µm (A-C, E) e 100 µm (D e F).



Fonte: acervo pessoal.

4.3 Cultura das CEM-TAh em biorreator

4.3.1 Avaliação da velocidade de agitação, da concentração do inóculo inicial e da porcentagem de oxigênio dissolvido

Com o intuito de estabelecer uma cultura em larga escala de CEM-TAh em biorreator, foram executados, inicialmente, três experimentos únicos (em monoclata) e distintos para avaliação da influência da velocidade de agitação (em rpm), da concentração do inóculo inicial (em células/MC) e da porcentagem de oxigênio dissolvido (OD) sobre o rendimento celular em 504 h de cultivo (21 dias). Cada situação experimental (B₁ com 60:1, 20% de OD e 70 rpm; B₂ com 30:1, 2% de OD e 70 rpm e B₃ com 30:1, 20% de OD e 50 rpm), foi realizada em sequência, com ajustes pontuais em um ou mais parâmetros avaliados (Tabela 6). Ao final, os experimentos foram comparados cineticamente e pelo fator de proliferação (Fp) para determinação do melhor rendimento celular, conciliado com o potencial de diferenciação *in vitro*, e o grau de fragmentação do DNA dado pelo ensaio cometa.

A Figura 18 apresenta a concentração de células/mL e a viabilidade diária das CEM-TAh aderentes dos cultivos B_1 , B_2 e B_3 . O Fp comparativo de cada dia do cultivo entre os experimentos é apresentado na Figura 19. A partir de cada perfil de crescimento foram obtidos os resultados cinéticos apresentados na Tabela 18.

Apesar da maior concentração final de células/mL apresentada pelo experimento $B_1 (2,4 \times 10^5)$ (Figura 18), isto se deve ao inóculo inicial ter sido o dobro (60:1; 4,8 x 10⁴ células/mL) que o presente nos cultivos $B_2 e B_3 (30:1; 2,4 \times 10^4)$. Esta maior concentração celular inicial, no entanto, não refletiu em maiores ganhos de rendimento, dado pelo Fp máximo alcançado pelo B_1 ter sido de 5,29 as 504 h de cultivo, enquanto o B_2 obteve um Fp de 6,67 as 456 h e o B_3 de 18,43 as 336 h (Figura 19). O experimento B_2 que iniciou com a mesma concentração de inóculo que a situação B_3 , porém na condição de 2% de OD e 70 rpm de agitação, não apresentou o mesmo desempenho de rendimento que seu experimento sucessor, dado pela menor concentração final de células/mL (7,3 x 10⁴ ante 1,9 x 10⁵ do B_3) (Figura 18) e pela inferioridade (p<0,05) nos Fp's em cada dia (Figura 19). Retomando o OD a 20% como no B_1 e reduzindo a velocidade de agitação para 50 rpm, o cultivo B_3 conseguiu apresentar um perfil de crescimento característico, com a fase estacionária (até 48 h), exponencial (240 a 336 h) e platô (360 a 480 h) ocorrendo ao longo do cultivo (Figura 18).

Figura 18 – Perfil de crescimento em células/mL e viabilidade (%) das CEM-TAh nas situações experimentais B_1 , B_2 e B_3 em biorreator.



B₁ (60:1; 20% OD; 70 rpm)

Experimentos em monoclata. Viabilidade (%) dada em média ± erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn. Significância estatística quando p<0,05.

Quanto a viabilidade celular, apesar de uma oscilação presente nos cultivos até as 72 h, todas as situações (B_1 , B_2 e B_3) apresentaram uma viabilidade elevada (>95%) das CEM-TAh aderentes (Figura 18), de forma que não houve diferença (p>0,05) entre os experimentos ao longo de todo o cultivo.

Figura 19 – Perfil de crescimento das CEM-TAh dado pelo fator de proliferação ao longo de cada dia de cultivo para os experimentos B_1 , B_2 e B_3 em biorreator.



Valores em média \pm erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn. ° Fp's não diferem estatisticamente entre si (p>0,05). * Fp's são similares (p>0,05) entre duas situações experimentais (B₂ e B₃ as 144 h; B₁ e B₂ as 192, 216, 360 e 504 h). Fp's ausentes de símbolo sobrescrito indicam diferença estatística (p<0,05) entre todos os cultivos.

O alto rendimento celular do B₃ indicado pelo seu Fp (Figura 19), ao longo das 504 h de cultivo também foi observado nos parâmetros cinéticos obtidos a partir da linearização da faixa exponencial de sua curva de crescimento (Figura 18). Conforme apresentado na Tabela 18, o cultivo B₃ apresentou a maior taxa de crescimento específica máxima (0,0088/h), o que fez com que obtivesse o menor tempo para duplicação celular (72.2 h) dentre as situações experimentais no biorreator. Além disso, sua produtividade celular no ponto máximo de crescimento, além de ter ocorrido com maior antecedência que os demais (336 h), foi o de maior rendimento (751.49 células/mL/h) (Tabela 18).

Os resultados até aqui sugerem, portanto, a adoção do protocolo de cultivo B₃ para obtenção de um maior rendimento celular das CEM-TAh, de forma que os experimentos em biorreator posteriores partiram de sua configuração (Tabela 6).

Parâmetros		Experimentos					
cinéticos	B ₁ (60:1; 20% OD; 70 rpm)	B ₂ (30:1; 2% OD; 70 rpm)	B ₃ (30:1; 20% OD; 50 rpm)				
Faixa exponencial do cultivo	168 a 288 h	192 a 288 h	240 a 336 h				
R ² da faixa exponencial	0.9328	0.9899	0.9412				
Equação da reta exponencial	y = 0.0027x + 11.24	y = 0.0056x + 9.543	y = 0.0088x + 9.644				
µ _{max} (taxa de crescimento específica máxima)	0.0027/h	0.0056/h	0.0088/h				
Tempo de duplicação exponencial	256.6 h	123.7 h	78.7 h				
Produtividade celular máxima	376.98 células/mL/h às 504 h de cultivo	125 células/mL/h às 456 h de cultivo	751.49 células/mL/h às 336 h de cultivo				

Tabela 18 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos B₁, B₂ e B₃ em biorreator.

4.3.1.1 Evolução da densidade celular dos MC

A densidade das CEM-TAh aderidas aos MC foi acompanhada as 24, 168, 336 e 504 h de cultivo através da coloração fluorescente com DAPI em cada uma das condições experimentais (B₁, B₂ e B₃). Conforme apresentado na Figura 20, é possível observar o aumento gradativo na cobertura das células aderidas sobre os MC porosos com o avançar do tempo em cultivo. Os MC da situação B₁ apresentaram uma maior quantidade de células aderidas após as primeiras 24 h de cultura em função da maior concentração celular inicial (Figura 20A). Enquanto o B₂ pouco alterou sua confluência até o final do cultivo (Figuras 20B, 20E, 20H e 20K), o B₃ rapidamente proliferou suas células, inicialmente escassas nos MC (Figuras 20C e 20F), de forma que as 336 h de cultivo, no pico da concentração celular do experimento (Figura 20A), já foram observados grandes acumulados de MC unidos pela elevada densidade das células aderidas (Figura 20I), que pouco se alterou até as 504 h do cultivo (Figura 20L). A formação de MC aderidos também ocorreu nos experimentos B₁ (Figuras 20D, 20G e 20J) e B₂ (Figuras 20E e 20H), no entanto foram escassos em frequência e no tamanho dos agregados.

Figura 20 – Marcação fluorescente com DAPI (cabeça de seta) para as CEM-TAh aderidas aos MC nos experimentos B₁ (A, D, G e J), B₂ (B, E, H e K) e B₃ (C, F, I e L) as 24 (A-C), 168 (D-F), 336 (G-I) e 506 h (J-L) de cultivo. Em cada figura é dado detalhe a densidade celular sobre os MC. Barras: 50 μ m (C, I e destaques das figuras A, C, D-F, H, I, K e L), 100 μ m (A, B, D-H, K e L e destaques das figuras B, G e J) e 200 μ m (J).



Fonte: acervo pessoal.

4.3.1.2 Mensuração dos agregados dos microcarregadores

O aumento da densidade celular acarretou na formação crescente de agregados entre os MC até as 336 h de cultivo conforme apresentado na Figura 21A-M. Ao final do cultivo (504 h), todas as situações experimentais, B_1 a B_3 , apresentaram redução no perímetro dos agregados (Figura 21A). A variação

período-dependente no tamanho dos agregados foi significativa (p<0,05) em determinadas comparações dentro de cada situação de cultivo ao longo do tempo e entre os diferentes cultivos avaliados, principalmente na comparação com o B₃ que apresentou o maior perímetro dos agregados de MC a partir das 336 h, diferindo (p<0,05) consigo mesmo as 24 e 168 h, e também na comparação com os demais.

Figura 21 – Mensuração (μ m) do perímetro dos agregados de MC ao longo dos cultivos B₁, B₂ e B₃ em biorreator. Coloração fluorescente com DAPI (B, C, D, G, I, K e M) e Laranja de acridina com brometo de etídeo (E, F, H, J e L). Barras: 100 μ m (B-K), 200 μ m (L e M).



Experimentos em monoclata.*Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o B₃ do mesmo período. ^a Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o perímetro da amostra B₁ de 168 h. ^b Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o perímetro da amostra B₂ de 504 h. ^c Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o perímetro da amostra B₃ de 24 e 168 h. Valores em média \pm erro padrão. Kruskal-Wallis, teste de Dunn. Fonte das imagens: acervo pessoal.

4.3.1.3 Viabilidade das CEM-TAh pelo MTT

A viabilidade das CEM-TAh pré (0 h) e pós-cultivo (504 h) em biorreator nas situações B_1 , B_2 ou B_3 foi determinada indiretamente pelo método colorimétrico do MTT através do grau de absorbância das amostras lidas após a solubilização dos cristais de formazan de cor roxa formados pela metabolização do reagente (Figura 22). A leitura indicou uma menor (p<0,001) produção de formazan pelas células do cultivo B_3 após as 504 h em cultura na comparação com o inóculo inicial do cultivo e com o mesmo período das situações B_1 e B_2 (p<0,05), que foram ausentes de um efeito negativo das 504 h em cultura sob a viabilidade celular (p>0,05).

Figura 22 – Viabilidade das CEM-TAh pré (0 h) e pós-cultivo (504 h) em biorreator nos experimentos B₁, B₂ e B₃. Viabilidade dada pela absorbância das amostras contendo a formazan dissolvida produzida pelas células em cada situação experimental após a subtração do seu respectivo branco.



Análise em decaplicata para cada amostra dos experimentos em monoclata. Absorbância dada em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney para as comparações entre as amostras de 0 e 504 h do mesmo cultivo e de Kruskal-Wallis (teste de Dunn) para as comparações das amostras do mesmo período entre os cultivos. *Diferença estatística (p bilateral <0,05) na comparação entre as amostras do mesmo cultivo. ^aDiferença estatística (p<0,05) com a amostra de 0 h do cultivo B₃. ^bDiferença estatística (p<0,05) com as amostras de 504 h dos cultivos B₁ e B₂.

4.3.1.4 Viabilidade das CEM-TAh em adesão aos MC

A viabilidade das células aderidas foi acompanhada ao longo do cultivo pela marcação fluorescente com LA/BE seguindo os critérios apresentados na sessão 3.15 (Figura 23). Em geral, as CEM-TAh aderentes aos MC se apresentaram predominantemente viáveis (verdes) nos períodos analisados de 24 (Figura 23A-C), 168 (Figura 23D-F), 336 (Figura 23G-I) e 504 h de cultivo (Figura 23J-L), para cada situação experimental (B₁, B₂ e B₃). As células em apoptose (alaranjadas) ou em

necrose (vermelhas) foram escassas, porém aumentaram gradativamente de incidência com o avançar do tempo em cultura (Figura 23G-L), principalmente no cultivo B₃ que alcançou um pico de densidade celular as 336 h e com isso uma maior presença das células em apoptose/necrose quando visualizado o interior dos densos agregados de MC do cultivo (Figura 23I). Com a diminuição da concentração celular e do tamanho dos agregados, a presença de células em apoptose ou necrose esteve reduzida as 504 h do cultivo B₃ (Figura 23L). A presença de células viáveis com lisossomos corados foi abundante (Figura 23G-L), mas não ocorreu em todas as células analisadas.

Figura 23 – Marcação fluorescente com LA/BE para as CEM-TAh aderidas aos MC nos experimentos B₁ (A, D, G e J), B₂ (B, E, H e K) e B₃ (C, F, I e L) as 24 (A-C), 168 (D-F), 336 (G-I) e 506 h (J-L) de cultivo. São visualizadas células viáveis (setas), em apoptose (cabeça de seta grossa) e em necrose (cabeça de seta fina). Em cada figura é dado detalhe a viabilidade das células sobre os MC ou das que se dissociaram na preparação da análise. Barras: 50 µm (A-C, E-H, K e L e destaques das figuras A-L) e 100 µm (D, I e J).



Fonte: acervo pessoal.

4.3.1.5 Fragmentação do DNA das CEM-TAh pelo ensaio cometa

O grau de fragmentação do DNA das células pré e pós-cultivo em biorreator foi acompanhada através do ensaio cometa realizado com o inóculo inicial (Controle negativo) e as 72, 144, 216, 288, 360, 432 e 504 h de cultura em cada situação experimental (B₁, B₂ e B₃). Conforme apresentado na Figura 24, houve uma correlação significativa (p<0,05) período-dependente entre o *score* de danos ao material genético das CEM-TAh, dado pela análise qualitativa (Figura 8), com o progresso do tempo em cultivo das células nos experimentos em biorreator.

Figura 24 – *Scores* do ensaio cometa das CEM-TAh obtidas do inóculo inicial (C-) e as 72, 144, 216, 288, 360, 432 e 504 h de cultura em biorreator (B₁, B₂ e B₃). Os danos ao DNA se correlacionaram (p<0,05) com o tempo das células em cultivo.



Scores (Equação 10) obtidos pelas amostras em duplicata dos experimentos em monoclata. Valores em linha média do maior e menor. C+ (Controle positivo). Correlação não paramétrica de Spearman dos scores linearizados. Significância estatística quando p<0,05.

4.3.1.6 Diferenciação adipogênica e osteogênica

O potencial de diferenciação *in vitro* das CEM-TAh em adipócitos (Figuras 25C, 25E e 25G) e osteócitos (Figuras 25D, 25F e 25H), avaliado ao final do cultivo de cada um dos experimentos em biorreator (B₁, B₂ e B₃), foi confirmado após a submissão aos meios específicos de diferenciação. Os Controles para a diferenciação celular foram ausentes de alterações morfológicas ou de reações que indicassem a presença dos produtos das diferenciações (Figura 25A-B).

Figura 25 - Diferenciação das CEM-TAh dos cultivos B₁ (C-D), B₂ (E-F) e B₃ (G-H) após 504 h de cultura em biorreator. Um exemplo de Controle para a diferenciação adipogênica (A) e osteogênica (B) das células pós-cultivo de cada situação em biorreator é apresentado. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela presença de vacúolos lipídicos no citoplasma das células coradas em vermelho com Oil Red O (C, E e G, setas pretas). A diferenciação osteogênica foi observada pela coloração da matriz celular calcificada em vermelho com o uso de Alizarin Red S (D, F e H, setas brancas). Barras: 50 μ m (C, E, G e H), 100 μ m (A, B e F), 200 μ m (D).



Fonte: acervo pessoal.

4.3.2 Otimização da concentração do inóculo inicial, da porcentagem de oxigênio dissolvido e do regime de renovação de meio

A partir das observações dos resultados referentes aos experimentos B₁ a B₃ foram conduzidos novos experimentos em biorreator que pudessem otimizar o rendimento celular em função da viabilidade e menor grau de danos ao DNA. Até aqui o cultivo B₃ foi o que apresentou o maior rendimento celular em 504 h de cultura, no entanto a elevada proliferação foi acompanhada de um alto grau de danos ao material genético indicado pelo ensaio cometa, além da formação de grandes agregados de MC que ocasionaram um prejuízo na viabilidade das células aderentes. Dessa forma, os cultivos B₄ e B₅ foram conduzidos com um menor tempo de cultura (216 h, equivalente a 9 dias), além disso, para minimizar a formação de agregados e manter a viabilidade das células aderentes, partiram de uma menor concentração celular inicial (1,2 x 10⁴ células/mL, equivalente a 15 células por MC) e foram submetidos a uma concentração crescente de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo (sendo 20% até as 96 h, 30% até as 144 h e 40% até as 216 h). As situações B₄ e B₅ diferiram quanto ao regime de renovação do meio de cultura, sendo que no cultivo B₄ as trocas de meio foram similares as situações B₁ a B₃ (25% de renovação a cada 72 h) e no cultivo B_5 foi de 25% a cada 48 h a partir do 3º dia (72 h).

A Figura 26 apresenta os perfis de crescimento das situações de cultivo B_4 e B_5 , acompanhado da viabilidade ao longo das 216 h em cultura e do fator de proliferação com a comparação estatística entre as situações experimentais. A Tabela 19 contém os resultados da cinética de proliferação com base em cada perfil de crescimento dos cultivos B_4 e B_5 .

Os cultivos apresentaram um rendimento celular similar ao longo da cultura (Figura 26), no entanto o B₅ adquiriu uma produtividade celular máxima com maior antecedência (168 h) comparativamente ao B₄ (216 h), obtendo dessa forma uma quantidade de células/mL/h mais elevada (Tabela 19). O período de proliferação exponencial foi o mesmo para ambos os cultivos (Figura 26A e B), e nessa faixa o tempo para duplicação da população celular foi menor para o cultivo B₅ (36.5 h ante os 48.5 h do B₄) (Tabela 19). Quando comparado o Fp de ambas as culturas (Figura 26C), o B₄ encerra as 216 h com um Fp superior (p>0,05) ao B₅ (18.1 contra 13.5). No entanto, ambas as situações obtiveram um Fp maior que o Fp dos cultivos B₁, B₂ e B₃ neste mesmo intervalo de tempo (3.1, 3.9 e 7.8, as 216 h respectivamente).

Figura 26 – Perfil de crescimento em células/mL e viabilidade (%) das CEM-TAh nas situações experimentais B₄ (A) e B₅ (B) em biorreator. Em C, comparação estatística do fator de proliferação ao longo de todo o cultivo. Setas pontilhadas indicam os momentos de renovação do meio de cultura.



Experimentos em monoclata. Em A e B, viabilidade (%) dada em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney (p>0,05). Em C, valores em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney. * Diferença estatística significativa (p bilateral <0,05).

Quanto a viabilidade celular, ela se manteve superior a 90% ao longo de todo cultivo para ambas as situações experimentais (p>0,05).

	Experimentos			
Parâmetros cinéticos	B ₄ - (15:1; 20 a 40% OD;	B₅ - (15:1; 20 a 40% OD;		
	50 rpm; 25% ren. c/ 72 h)	50 rpm; 25% ren. c/ 48h)		
Faixa exponencial do cultivo	72 a 168 h	72 a 168 h		
R ² da faixa exponencial	0.8516	0.9667		
Equação da reta exponencial	y = 0.0143x + 9.250	y = 0.01908x + 8.811		
µ _{max} (taxa de crescimento específica máxima)	0.0143/h	0.01908/h		
Tempo de duplicação exponencial	48.5 h	36.3 h		
Produtividade celular máxima	689.81 células/mL/h às 216 h de cultivo	809.52 células/mL/h às 168 h de cultivo		

Tabela 19 – Parâmetros cinéticos da fase proliferativa avaliados nos cultivos $B_4 e B_5$ em biorreator.

4.3.2.1 Evolução da densidade celular dos MC

A densidade das CEM-TAh aderidas aos MC foi acompanhada as 24, 120 e 216 h de cultivo nas situações experimentais $B_4 e B_5$ em biorreator através da coloração fluorescente com DAPI (Figura 27). Com um menor inóculo inicial, os MC dos cultivos $B_4 e B_5$ apresentaram uma escassez de células aderidas observadas após as primeiras 24 h de cultura (Figura 27A-B), no entanto com 120 h de cultivo os MC já possuíam uma moderada cobertura dada pelas CEM-TAh (Figura 27D-E) e já foram visualizados os primeiros agregados de MC. Com 216 h de cultivo a maior parte dos MC já se encontrava com confluência superior a 70% e agregados de maior volume já podiam ser observados unidos pela população das células aderidas que faziam a conexão entre as estruturas macroporosas (Figura 27G-H). Não houve distinção entre a densidade de cobertura das células aderentes sobre os MC nas condições de cultivo $B_4 e B_5$. **Figura 27** – Marcação fluorescente com DAPI (setas) para as CEM-TAh aderidas aos MC nos experimentos B_4 (A, C e E) e B_5 (B, D e F) as 24 (A e B), 120 (C e D) e 216 h (E e F) de cultivo. Em cada figura é dado detalhe a densidade celular sobre os MC. Barras: 50 µm (A-C, E, F e destaques das figuras A-F), 100 µm (C).



Fonte: acervo pessoal.

4.3.2.2 Mensuração dos agregados dos microcarregadores

Os agregados de MC observados no decorrer do cultivo através das preparações para as análises de densidade celular pela coloração fluorescente com

DAPI e de viabilidade das células aderentes com a LA/BE tiveram o perímetro mensurado as 24, 120 e 216 h nos cultivos B_4 e B_5 em biorreator (Figura 28). O tamanho dos agregados aumentou (p<0,05) com o avançar do tempo em cultura em ambas as situações sem diferirem entre si (p>0,05) (Figura 28), porém o perímetro médio dos agregados ao final dos cultivos B_4 e B_5 às 216 h de cultura foi inferior ao que já apresentavam os cultivos B_1 a B_3 as 168 h (>1500 µm) (Figuras 21A e 28A).

Figura 28 – Mensuração (μ m) do perímetro dos agregados de MC ao longo dos cultivos B₄ e B₅ em biorreator. Coloração fluorescente com DAPI (D, E e G) e Laranja de acridina com brometo de etídeo (B, C e F). Barras: 200 μ m (B-G).



Experimentos em monoclata. ^aDiferença estatística (p<0,05) na comparação com o perímetro dos agregados as 24 e 120 h de cultivo do mesmo cultivo. ^bDiferença estatística (p<0,05) na comparação com o perímetro dos agregados as 24 de cultivo do mesmo cultivo. Valores em média ± erro padrão. Kruskal-Wallis (teste de Dunn). Fonte das imagens: acervo pessoal.

4.3.2.3 Viabilidade das CEM-TAh pelo MTT

As CEM-TAh pré e pós-cultivo nas situações B_4 e B_5 em biorreator foram analisadas através do método colorimétrico do MTT para determinação indireta da viabilidade. Conforme a Figura 29 apresenta, os cultivos B_4 e B_5 diferiram (p bilateral <0,05) na absorbância lida em função do grau de solubilização dos cristais de formazan de cor roxa provenientes da metabolização do reagente. O cultivo B_4 apresentou uma maior (p<0,05) produção de formazan tanto quando em comparação com as células provenientes das 216 h de cultivo da situação B_5 , quanto na comparação com as células de seu inóculo inicial (0 h). Suas células précultivo inclusive apresentaram uma viabilidade superior (p<0,05) quando comparadas com o pré-cultivo do B_5 , as quais não diferiram (p>0,05) na comparação com as células provenientes das 216 h de sua cultura (Figura 29).

Figura 29 – Viabilidade das CEM-TAh pré (0 h) e pós-cultivo (216 h) em biorreator nos experimentos $B_4 e B_5$. Viabilidade dada pela absorbância das amostras contendo a formazan dissolvida produzida pelas células em cada situação experimental após a subtração do seu respectivo branco.



Análise em decaplicata para cada amostra dos experimentos em monoclata. Absorbância dada em média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney. *Diferença estatística (p bilateral <0,05) na comparação com a amostra de 0 h do mesmo cultivo. ^aDiferença estatística (p bilateral <0,05) com a amostra de 0 h do cultivo B₅. ^bDiferença estatística (p bilateral <0,05) com a amostra de 216 h do cultivo B₄.

4.3.2.4 Viabilidade das CEM-TAh em adesão aos MC

A viabilidade das células aderidas aos MC dos cultivos B₄ e B₅ em biorreator foi acompanhada através da marcação fluorescente com LA/BE e é apresentada na Figura 30. Os MC apresentaram uma alta incidência de células aderentes viáveis (cor verde) do início até o final das 216 h de cultivo para ambas as situações experimentais (Figura 30). A presença de células em apoptose (cor amarelada) foi escassa e mais recorrente no cultivo B_5 , no entanto, sem haver uma relação período-dependente (Figura 30B, 30D e 30F). Células em necrose (cor vermelha) foram raras, mesmo quando no interior dos maiores agregados de MC presentes (Figuras 30E-F). CEM-TAh viáveis com abundante presença de vesículas de lisossomos corados em vermelho foram marcantes ao longo do cultivo, principalmente as 216 h.

Figura 30 – Marcação fluorescente com LA/BE para as CEM-TAh aderidas aos MC nos experimentos B₄ (A, C e E) e B₅ (B, D e F) as 24 (A e B), 120 (C e D) e 216 h (E e F) de cultivo. São visualizadas células viáveis (setas), em apoptose (cabeça de seta grossa) e em necrose (cabeça de seta fina). Em cada figura é dado detalhe a viabilidade das células sobre os MC. Barras: 50 µm (A, C-F e destaques das figuras A-F) e 100 µm (B).



Fonte: acervo pessoal.

4.3.2.5 Fragmentação do DNA das CEM-TAh pelo ensaio cometa

As CEM-TAh do inóculo inicial (Controle negativo) e as recuperadas ao longo do cultivo (72, 144 e 216 h) nas situações B_4 e B_5 em biorreator foram acompanhadas quanto ao grau de fragmentação do DNA através do ensaio cometa. Houve aumento do *score* de danos ao material genético das CEM-TAh em função do tempo em cultura (Figura 31), superando o valor apresentado pelo Controle negativo. Ao final do cultivo (216 h) os *scores* alcançaram valores mais próximos ao do Controle positivo principalmente no B_4 (Figura 31). Comparando o B_4 e B_5 com os *scores* apresentados pelos cultivos B_1 a B_3 para as 216 h de cultura se observam valores similares, com *score* entre 200 e 250 (Figuras 24 e 31). Apesar da tendência de aumento do *score* em função do tempo das células em cultura, como observado graficamente, o teste de correlação não foi significativo (p>0,05) com esta quantidade de dados amostrais.

Figura 31 – *Scores* do ensaio cometa das CEM-TAh obtidas do inóculo inicial (C-) e as 72, 144 e 216 h dos cultivos B_4 e B_5 em biorreator. Apesar da tendência, não houve correlação dos danos ao DNA com o tempo das células em cultivo (p>0,05).



Scores (Equação 10) obtidos pelas amostras em duplicata dos experimentos em monoclata. Valores em linha média do maior e menor. C+ (Controle positivo). Correlação não paramétrica de Spearman dos scores linearizados. Significância estatística quando p<0,05.

4.3.2.6 Senescência das CEM-TAh pela coloração para detecção da β galactosidase

O grau de senescência das CEM-TAh pré e pós-cultivo nas situações B_4 e B_5 em biorreator foi avaliada pela coloração para detecção da atividade da enzima β -galactosidase presente quando em células senescentes. Conforme apresentado na Figura 32, a atividade da enzima foi escassa nas células do inóculo inicial de ambos os cultivos B_4 e B_5 (Figura 32A e 32C), no entanto após as 216 h em cultura uma quantidade maior de CEM-TAh recuperadas dos MC apresentou reação positiva para a coloração, indicando uma maior presença da atividade da β -galactosidase (Figura 32B e 32D). Não houve diferença qualitativa da abundância de atividade da enzima entre os cultivos B_4 e B_5 .

Figura 32 – Coloração para detecção da atividade da β -galactosidase submetida as CEM-TAh obtidas do inóculo inicial do B₄ (A) e B₅ (C) e após as 216 h (B e D) dos respectivos cultivos em biorreator. Reação positiva para a presença da enzima indicada pela coloração azulada em meio ao citoplasma (setas). Barras: 50 µm.



Fonte: acervo pessoal.

4.3.2.7 Teste do micronúcleo

A avaliação da mutagenicidade das CEM-TAh cultivadas nas situações B_4 e B_5 em biorreator foi realizada através do teste do micronúcleo. Conforme apresentado na Figura 33, a frequência de células micronucleadas aumentou após as 216 h em cultura comparativamente ao inóculo inicial (C-) em ambas as situações experimentais (11,5 as 0 h contra 20 as 216 h para o B_4 e 9,5 as 0 h contra 17 as 216 h para o B_5), no entanto, apesar do aumento observado na frequência de micronúcleos, ocorreu diferença estatística (p<0,05) apenas na comparação entre o C+ com os demais grupos do mesmo experimento. Os cultivos B_4 e B_5 também não diferiram na comparação para as 216 h entre si (p>0,05) (Figura 33).

Figura 33 – Frequência de CEM-TAh micronucleadas após submissão ao teste do micronúcleo com amostras do inóculo inicial (C-) e após as 216 h do cultivo $B_4 e B_5$ em biorreator. Para ambas as culturas também foram realizadas o controle positivo (C+) com o tratamento das células com agente genotóxico mitomicina C.



Análise em quadruplicata para cada amostra dos experimentos em monoclata. Frequência dada em média ± erro padrão. Kruskal-Wallis (Teste de Dunn) para as comparações entre os grupos do mesmo cultivo. Teste de Mann-Whitney para a comparação entre o B₄ e B₅ para as 216 h (considerado o valor de p bilateral). *Diferença estatística (p<0,05) na comparação com os demais grupos do mesmo cultivo.

Resultados similares foram obtidos para o Índice de Divisão Nuclear (IDN), com ambos os C+ apresentando um menor (p<0,05) índice de células em proliferação após a submissão ao agente genotóxico Mitomicina C na comparação com as células pré e pós-cultivo B_4 ou B_5 em biorreator que não diferiram entre si (p>0,05) (Figura 34). Dessa forma, as 216 h o IDN do cultivo B_4 foi de 1,41 ante os 1,42 de suas células pré-cultivo e no B_5 o IDN foi de 1,36 tanto para o inóculo inicial (C-) quanto para as células das 216 h de cultivo.

Figura 34 – Índice de Divisão Nuclear (Equação 11) das CEM-TAh após submissão ao teste do micronúcleo com amostras do inóculo inicial (C-) e após as 216 h do cultivo B_4 ou B_5 em biorreator. Para ambas as culturas também foram realizadas o controle positivo (C+) com o tratamento das células com agente genotóxico mitomicina C.



Análise em quadruplicata para cada amostra dos experimentos em monoclata. IDN dado em média \pm erro padrão. Kruskal-Wallis (Teste de Dunn) para as comparações entre os grupos do mesmo cultivo. Teste de Mann-Whitney para a comparação entre o B₄ e B₅ para as 216 h (considerado o valor de p bilateral). *Diferença estatística (p<0,05) na comparação com os demais grupos do mesmo cultivo.

4.3.2.8 Caracterização dos marcadores de superfície

A caracterização imunofenotípica foi realizada com as CEM-TAh do cultivo B₅ após as 216 h em cultura através da análise de citometria de fluxo, e os resultados são apresentados na Figura 35. As células analisadas, cuja proveniência é do mesmo doador de CEM-TAh utilizado nos experimentos anteriores (B₁ a B₄), apresentaram um percentual superior a 98% para a presença dos marcadores CD73 e CD90, e inferior a 1% para os marcadores HLA-DR, CD34 e CD45 (Figura 35), conforme o preconizado pela ISCT que demonstraram a ausência de influência do cultivo em larga escala em biorreator sobre a identidade celular das CEM.

Figura 35 – Histogramas representativos da citometria de fluxo para a imunofenotipagem das CEM-TAh provenientes do experimento B_5 em biorreator após as 216 h de cultivo. A análise imunofenotípica apresentou reação positiva (>0,98%) para os marcadores CD73 e CD90 e negativa (<1%) para os marcadores HLA-DR, CD34 e CD45.



4.3.2.9 Diferenciação in vitro

As CEM-TAh pós-cultivo B_4 e B_5 em biorreator foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica, e após a submissão ao protocolo do fabricante as diferenciações puderam ser confirmadas pela reação das células com os corantes que possuíam afinidade para lipídeos

(adipócitos) e cálcio (osteócitos) (Figura 36C-F). Juntamente foi realizado para os testes de cada cultura o Controle negativo (cultivado sob o mesmo protocolo, porém ausente dos meios de diferenciação), que foram ausentes de alterações morfológicas ou de reações positivas com os corantes específicos de identificação (Figura 36A-B).

Figura 36 - Diferenciação das CEM-TAh dos cultivos B_4 (C e D) e B_5 (E e F) após as 216 h de cultura em biorreator. Um exemplo de Controle para a diferenciação adipogênica (A) e osteogênica (B) das células pós-cultivo de cada situação em biorreator é apresentado. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela presença de vacúolos lipídicos no citoplasma das células coradas em vermelho com Oil Red O (C e E, setas pretas). A diferenciação osteogênica foi observada pela coloração da matriz celular calcificada em vermelho com o uso de Alizarin Red S (D e F, setas brancas). Barras: 50 μ m (A-C e E), 100 μ m (D e F).



Fonte: acervo pessoal.
5 DISCUSSÃO

Apesar da utilização crescente de CEM-TAh em diversos procedimentos de terapia celular, a literatura ainda carece de maiores estudos quanto a melhor forma de cultivo desse tipo celular em diferentes plataformas. Além disso, não foram encontrados trabalhos que conciliem o desenvolvimento de um protocolo de cultivo que seja eficiente em rendimento e monitorado quanto à integridade genômica ao longo de todo o processo. Dessa forma, o presente estudo vem ocupar esta lacuna do conhecimento através da avaliação de parâmetros básicos relacionados a proliferação das CEM-TAh em cultura estática, e sob duas plataformas de cultivo em suspensão: em menor escala com frasco spinner e em larga escala com a utilização de um biorreator tipo tanque agitado. Para este propósito, foram avaliados a cinética de proliferação das CEM-TAh nas três plataformas de cultivo, além de diferentes condições de inóculo inicial, volume de meio de cultura, velocidade de agitação, protocolos de adesão a microcarregadores, assim como parâmetros relacionados ao metabolismo celular, como o consumo de nutrientes e metabólitos, regimes de renovação do meio de cultura, concentração de SFB e de OD, além da caracterização das células como CTM com a identificação imunofenotípica e do potencial de diferenciação após os procedimentos de cultura.

A proliferação celular em cultura estática com a utilização de frascos-T é a tecnologia padrão e a mais básica para a proliferação de CEM em escala laboratorial e de uso clínico. No entanto, apesar da simplicidade, este tipo de cultura não permite uma produção em larga escala com custos compensatórios. Além disso, traz como desvantagens a manipulação excessiva através de repiques para a colonização de novas garrafas, o que pode interferir nas propriedades funcionais das células, além do maior risco de contaminação, da ausência de controle de parâmetros como pH e oxigênio dissolvido do cultivo e do tempo prolongado em manipulação para a geração de uma quantidade adequada de células (SCHOP et al., 2008). Dessa maneira, sendo o cultivo em frascos-T uma etapa necessária entre a obtenção das células extraídas do doador e a cultura celular de larga escala em suspensão, Simão e colaboradores (2019) desenvolveram a primeira parte deste trabalho que objetivou investigar uma possível influência do volume de meio de cultura no rendimento das CEM-TAh em cultura estática.

Os resultados demonstraram que não houve influência do volume de meio

de cultura (5, 10 ou 15 mL, com renovação de 50% do meio a cada 48 h) sobre o rendimento das CEM-TAh cultivadas por 192 h a uma densidade inicial de 3.000 células/cm² em frascos-T de 25 cm². Além disso, os resultados mostraram que mesmo as células cultivadas no menor volume de meio (5 mL), e consequentemente com menor disponibilidade de nutrientes e maior concentração de metabólitos em função do tempo em cultivo, conseguiram apresentar um rendimento similar ao das células cultivadas no maior volume de meio de cultura (15 mL), cuja disponibilidade de glicose e glutamina foi superior e de lactato e glutamato esteve mais diluída.

Estes resultados se devem a concentração de nutrientes do grupo de 5 mL que esteve acima do mínimo necessário para limitar a proliferação celular, que é de 0,13 mM a 1 mM para a glicose (ante o mínimo de 1,84 mM apresentado pelo grupo de 5 mL às 192 h de cultivo) e de 0,09 a 0,15 mM para a glutamina (com 0,89 mM apresentado pelo grupo de 5 mL às 192 h de cultivo) (FOLLMAR et al., 2006). Assim como, a concentração de metabólitos como o lactato esteve inferior aos 35,4 mM limitantes para o cultivo celular (máximo de 7,62 mM no grupo de 5 mL para as 192 h de cultivo) (SCHOP et al., 2009). Desta forma, o estudo concluiu que o volume de meio de cultura de 5 mL para um frasco-T de 25 cm² com uma renovação parcial de 50% a cada 48 h, pode ser estabelecido como o padrão para esta etapa do cultivo de CEM-TAh em cultura estática (SIMÃO et al., 2019 – Apêndice A).

O efeito da manipulação de uma série de variáveis de um protocolo de cultura na eficiência de adesão celular, com consequência para o rendimento final do cultivo foi demonstrado primeiramente por Forestell e colaboradores (1992) com a utilização de células MRC-5 em microcarregadores Cytodex-1. Posteriormente, Yuan e colaboradores (2014) aperfeiçoaram o cultivo de CEM-MOh com MC Cultispher-S em cultura de suspensão em frasco *spinner* e obtiveram uma otimização do protocolo de cultivo a partir da manipulação de variáveis como a razão de células por MC e seu sistema inicial de adesão, o pH do cultivo, a concentração de SFB, a velocidade de agitação e o regime de renovação do meio de cultura. Dos Santos e colaboradores (2014) por sua vez, trabalharam com CEM-TAh em frasco *spinner* e biorreator tipo tanque agitado para avaliar diferentes concentrações de OD e de regimes de renovação do meio de cultura em condições *xeno-free*. Baseado nestes trabalhos, e com a carência de estudos até aqui que definissem as melhores condições de cultivo das CEM-TAh em suspensão para diversos parâmetros em um mesmo bioprocesso, foram desenvolvidos neste projeto

os experimentos com a cultura das CEM-TAh em pequena e larga escala através das plataformas de cultivo em suspensão em frasco *spinner* e biorreator.

Inicialmente foi avaliado o protocolo de adesão e a velocidade de agitação aplicada ao inóculo inicial em frasco spinner. Apesar de haver trabalhos que relatem melhores resultados com uma agitação contínua (30 rpm por 15 ou 18 h) durante a fase de inoculação (SKOOG et al., 2009; CARMELO et al., 2014), a grande parte dos estudos utiliza o regime de agitação intermitente para a adesão celular em MC com uma ampla variedade de intervalos entre as agitações (ciclos de agitação a cada 10, 25 ou 30 minutos podendo seguir ou não para um período de 3 a 6 h sem agitação), distintas velocidades de rotação (25, 30, 60, 70, 100 ou 400 rpm) e períodos de duração do regime (6, 12, 18 ou 24 h) (SANTOS et al., 2011; CARUSO et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2014; YUAN et al., 2014; FERNANDES-PLATZGUMMER et al., 2016). Neste estudo o melhor desempenho foi alcançado pela condição S₁ (intermitente com agitação por 3 m a 70 rpm a cada 27 m estático durante as 3 h iniciais, finalizando com 3 h a 0 rpm), enquanto Yuan e colaboradores (2014) obtiveram resultados melhores com o regime intermitente a 100 rpm de 24 h que apresentava uma eficiência de adesão de 34% nas 4 h iniciais, contra 23% do S₁ no mesmo período. No entanto, ao final das 24 h o regime intermitente a 70 rpm terminou com 56% de eficiência de adesão, similar ao alcançado pelo trabalho com CEM-MOh e superior a condição intermitente testada com 100 rpm deste presente trabalho que foi de apenas 30%. Desta forma, o protoloco deste regime foi aplicado aos demais experimentos em frasco spinner e também aos realizados no biorreator.

Tendo em vista que a adesão de uma célula com um MC requer o contato por um breve período de tempo, a condição intermitente favorece dessa maneira a adesão celular ao fornecer um período ausente de agitação onde as células poderão se instalar sobre os MC de uma forma mais bem sucedida. A agitação contínua por sua vez, promove um número de contatos entre as células com os MC muito superior, potencializado pela utilização de 50% do volume de trabalho que concentra as células e os MC num volume menor durante o período da fase de inoculação nos experimentos em frasco *spinner*. Essas interações, no entanto, são mais curtas na agitação contínua, fazendo com que apenas uma pequena proporção delas obtenha sucesso, dessa forma as maiores eficiências de adesão são obtidos pela agitação intermitente (YUAN et al., 2014). Carmelo e colaboradores (2014) contrapõem que o regime intermitente ocasiona a maior formação de agregados de MC, geralmente prejudicial ao cultivo, no entanto, Yuan e colaboradores (2014) defendem que a agitação intermitente quando em velocidades mais elevadas (100 rpm) têm a menor tendência de formação de agregados comparativamente a utilização de velocidades menores (60 rpm). Nos experimentos deste estudo, não ocorreu a formação de agregados nas 24 h iniciais com a condição intermitente de 70 rpm para os cultivos em biorreator onde todos iniciavam com 100% do volume de trabalho, no entanto, para os cultivos em frasco *spinner*, onde o regime de adesão foi realizado com 50% do volume de trabalho, a presença de agregados de MC ao final da fase de inoculação foi maior, porém, com o prosseguimento do cultivo em agitação contínua na fase proliferativa, a maior parte dos agregados acabava se desfazendo.

A adesão celular é um processo aleatório que segue uma distribuição de Poisson, o que significa que o número de células por MC varia dentro de um intervalo (FRAUENSCHUH et al., 2007). Para minimizar o número de MC ausentes de células são incluídos uma maior quantidade de células por unidade de MC, no entanto, uma quantidade elevada de células/MC tende a ser evitada, pois aumenta a proporção de células que permanecem desaderidas e morrem, desperdiçando assim parte do inóculo (YUAN et al., 2014). Dessa forma, é importante determinar a proporção de células/MC que minimize o número de células perdidas e de MC vazios. Nos estudos com frasco spinner foram avaliados três proporções distintas de células/MC (9:1, 30:1 e 60:1) e no biorreator o primeiro experimento iniciou com 60:1 (B_1) e posteriormente foram avaliadas concentrações menores de 30:1 $(B_2 e B_3)$ e 15:1 (B₄ e B₅). O melhor desempenho alcançado dentre os frascos spinners ao final das 24 h de cultivo foi com o S₅ de 30:1 que conciliou uma boa eficiência de adesão (47,4%) com uma elevada viabilidade (95,7%) na comparação com o S1 de 9:1 (79,8%), e, desta maneira, foi adotado para os experimentos seguintes em frasco spinner. Outro autores (HEWITT et al., 2011; YUAN et al., 2014) obtiveram uma proliferação melhor com a utilização de uma proporção de 5:1. A proporção de 60:1 foi a que apresentou a menor eficiência de adesão (38,6%) dentre as avaliações deste parâmetro em pequena escala, apesar disso foi adotada para o primeiro experimento em biorreator (B_1) e seu desempenho foi decepcionante, com um fator de proliferação máximo de 5,29 contra os 18,43 do B₃ com 30:1 e 18,15 do B₄ com 15:1, desta forma a proporção 15:1 ficou determinada para os cultivos em biorreator.

A cultura celular de mamíferos requer nutrientes complexos que tradicionalmente são fornecidos na forma de um meio de cultura rico em fatores de

crescimento e, portanto, suplementada com Soro Fetal Bovino (SFB) (RAFIQ, 2016). No entanto, não há consenso na literatura sobre a necessidade da presença de SFB para a adesão celular aos MC. O soro contém fibronectina, que auxilia algumas linhagens celulares a se prenderem e se espalharem sob a superfície de cultivo, porém, outros tipos de células, como os fibroblastos, podem secretar a própria fibronectina, evitando assim a necessidade do SFB durante a adesão celular (YUAN et al., 2014). Neste estudo, as CEM-TAh apresentaram a maior eficiência de adesão aos MC Cultispher-S ao final das 24 h iniciais quando cultivadas em meio com 10% de SFB (47,4%). As demais situações, ausente de SFB ou com 20%, apresentaram as maiores eficiências de adesão até as 8 h de cultura, quando então reduziram os valores para 33,4% e 27,3% respectivamente.

Como neste estudo levou-se em consideração os valores do final das 24 h de avaliação, a concentração de 10% ficou definida para os experimentos em frasco spinner posteriores e também foi o aplicado aos cultivos em biorreator. Yuan e colaboradores, também obtiveram o mesmo perfil de resultado com a utilização de CEM-MOh para a adesão ao MC gelatinoso e macroporoso Cultispher-S na comparação entre 0, 5 e 10% de SFB, em que a concentração de 10% obteve uma eficiência de adesão superior aos demais ao final das 24 h de avaliação e com a ausência de SFB apresentando a melhor eficiência até as 4 h de cultivo, porém diferentemente deste estudo, os autores adotaram para os experimentos em spinner posteriores, a ausência de SFB até as 8 h de cultura, seguido do complemento do meio com 10% de SFB e assim obtiveram uma maior eficiência de adesão sem impactar negativamente na fase proliferativa. Esta estratégia convém ser analisada posteriormente em novos experimentos com CEM-TAh em suspensão, assim como o desenvolvimento otimizado de um cultivo em condições xeno-free que substituam o SFB por um meio com uma mistura própria de proteínas, incluindo a albumina e os fatores de crescimento do soro humano e que evitem outros vestígios não humanos ou derivado de animais, tais como já desenvolvido com CEM-TAh por outros autores (SANTOS et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2014; CARMELO et al., 2015; TAN et al., 2015; FERNANDES-PLATZGUMMER et al., 2016; CUNHA et al., 2017).

Até aqui, os parâmetros definidos correspondem ao período de inoculação dos cultivos em suspensão (neste estudo, correspondente as 24 h de cultivo iniciais). Ao definir a melhor estratégia para adesão das CEM-TAh aos MC Cultispher-S, além da concentração do inóculo inicial e de SFB a partir das

comparações entre variáveis de cada parâmetro avaliado e considerando a viabilidade das células em cada caso, potencializa-se o rendimento celular do período mais longo da cultura celular, a fase proliferativa. Ela compreende desde as 24 h após a inoculação, quando as células já estão minimante adaptadas a plataforma de cultivo em suspensão e iniciam o processo de duplicação celular, até o final da cultura com a ocorrência ou não da fase estacionária. A própria fase proliferativa é passível de otimização para favorecer uma maior produtividade celular, desta forma foram avaliados neste período a velocidade de agitação e o regime de renovação do meio de cultura, além disso, para os experimentos em biorreator, também foram testadas diferentes concentrações de oxigênio dissolvido.

Já é bem relatado na literatura que a agitação do meio de cultivo proporciona um ambiente físico e químico homogêneo, melhorando a transferência de massa e reduzindo os gradientes de concentração (NIENOW, 2006). Além disso, um ambiente agitado expõe a totalidade da área superficial dos MC às células, potencializando a adesão celular, assim como uma velocidade de agitação mais alta melhora a homogeneidade da cultura e promove um fluxo convectivo para os MC macroporosos, proporcionando melhor acesso ao oxigênio e nutrientes, bem como a remoção de resíduos metabólicos (YUAN et al., 2014). No entanto, velocidades de agitação superiores a 100 rpm podem remover as células dos MC pelo cisalhamento e aumentar a quantidade de debris celulares, indicando que uma porcentagem significativa das células desaderidas foi destruída. Portanto, neste estudo foram avaliados duas velocidades de agitação de intensidade baixa (50 rpm) a moderada (70 rpm) que melhor pudessem contribuir para o maior rendimento e viabilidade celular. Ambas as velocidades foram testadas pois promoviam a completa suspensão dos MC no meio de cultura sob agitação. Em frasco spinner, o cultivo com 50 rpm apresentou o maior rendimento celular em termos de células/mL, produtividade celular máxima, taxa de crescimento específica máxima e menor tempo de duplicação comparativamente a condição com 70 rpm. Nos cultivos em biorreator, iniciou-se com a avaliação a 70 rpm para os experimentos B₁ e B₂, porém ao reduzir a velocidade para 50 rpm e o inóculo inicial de 60:1 para 30:1 foi observado um rendimento celular significativamente superior para o B₃. Sendo assim, a velocidade de 50 rpm ficou definida para ser aplicada aos experimentos posteriores em ambas as plataformas de cultivo.

A definição de um regime para a renovação do meio de cultura que seja

capaz de manter os nutrientes em níveis adequados para o cultivo em proliferação e que remova o excesso de metabólitos, é essencial para otimizar o rendimento celular. Sabe-se que nutrientes como glicose e glutamina são usadas para a geração de energia e devem ser mantidas acima dos valores limitantes, assim como o lactato e a amônia são produtos do metabolismo e conhecidos por inibir o crescimento celular de mamíferos em altas concentrações (YUAN et al., 2014). Este trabalho previamente relatou que o rendimento celular é mantido de forma similar em cultura estática mesmo que as concentrações de nutrientes estejam muito acima do requerido pelas células ao longo do cultivo (SIMÃO et al., 2019), dessa forma conseguir manter um equilíbrio entre o acréscimo de meio novo e a remoção de meio concentrado em metabólitos, é importante para a redução dos custos do processo de cultivo e para se evitar o desperdício de meio de cultura.

Dessa forma foram conduzidos em frasco spinner cinco diferentes regimes de renovação do meio, desde a completa ausência de renovação (S₁₁), até a máxima renovação possível (50% de troca a cada 48 h a partir do 3º dia de cultivo) (S₁₃). Os melhores resultados cinéticos avaliados na fase exponencial de cada cultura foram da situação S13, apesar disso, foi a situação S14 com 50% de renovação a cada 72 h quem apresentou a maior produtividade celular máxima, além de ter obtido a maior concentração final de células/mL dentre todas as condições testadas e alcançado a máxima concentração de células/mL do S₁₃ com 48 h de antecedência. Por estes fatores, aliado a intenção de redução nos custos de utilização do meio de cultura e de manipulação dos frascos de cultivo, que a condição S₁₄ ficou definida para o cultivo de CEM-TAh em frasco spinner. Outros trabalhos definiram uma troca de meio ainda mais econômica para o cultivo de CEM, tais como a renovação de 50% a cada 3 dias (SCHOP et al., 2010) ou a execução de uma única troca de 25 ou 50% apenas no 6º dia de um total de 9 dias de cultura (YUAN et al., 2014). Yuan e colaboradores observaram ausência de diferença no rendimento celular ou alteração significativa na concentração dos nutrientes e metabólitos comparativamente a situação ausente de renovação de meio, porém alertam que o regime de renovação é muito dependente do inóculo inicial e da concentração celular ao longo do cultivo.

Nos experimentos em biorreator, o regime de renovação de meio executado nos cultivos B_1 a B_4 foi de 25% a cada 72 h, e posteriormente, a fim de avaliar uma possível influência no rendimento celular até as 216 h de cultivo, foi submetido ao B_5

uma renovação parcial de 25% do volume de trabalho a cada 48 h. A comparação entre as situações B_4 e B_5 obteve resultados variados conforme a análise. Considerando-se apenas a concentração de células/mL, ela foi superior para o cultivo B_4 apenas para a última amostragem realizada às 216 h de cultivo, no entanto, levando-se em conta a fase de crescimento exponencial, observa-se um rendimento melhor do cultivo B_5 , com menor tempo para duplicação celular (36.3 h contra 48.5 h do B_4), maior μ_{max} , e maior produtividade celular máxima obtida com 48 h de antecedência comparativamente ao B_4 . Sendo, portanto, o cultivo B_5 definido como a condição otimizada de melhor rendimento para a cultura das CEM-TAh em biorreator tipo tanque com agitação.

Possivelmente o fato do cultivo B₅ ter passado por uma inclusão de novos nutrientes em seu meio de cultura no início (72 h) e meados (120) de sua fase exponencial, pode ter contribuído para o alto rendimento celular observado, enquanto que no cultivo B₄ ocorreu uma renovação parcial apenas no início (72 h) e já próximo (144 h) do fim (168 h) de seu crescimento exponencial. Outros autores, no entanto, não observaram influência do regime de renovação do meio de cultura na densidade celular dos cultivos em biorreator. Dos Santos e colaboradores (2014), observaram que apesar das diferenças observadas nos níveis de nutrientes e metabólitos, a concentração de células/mL foi similar entre os cultivos com renovação diária de 25% do meio, 25% a cada 48 h e suplementação do meio com concentrado nutricional. Os autores enfatizaram que a vantagem em dar um intervalo maior de tempo entre as renovações do meio de cultura, possibilita a maior concentração dos fatores autócrinos produzidos pelas CEM os quais são importantes para a proliferação celular (DOS SANTOS et al., 2014).

Por fim, os cultivos em biorreator foram avaliados quanto a possibilidade de influência da concentração de oxigênio dissolvido (OD) no rendimento e viabilidade celular. O controle da concentração de oxigênio dissolvido disponível no meio de cultura, possibilitado pelo cultivo em plataformas automatizadas como um biorreator é feito com o objetivo de aproximar as condições de cultivo *in vitro* com o ambiente *in vivo* das quais as células cultivadas foram extraídas (FERNANDES-PLATZGUMMER et al., 2014; RAFIQ, 2016). Diversos trabalhos relatam que a condição normóxia, isto é, 20% de OD, promove um rendimento celular inferior a condição hipóxia de 2 a 5% de OD para as CEM (GRAYSON et al., 2007; ESTRADA et al., 2012; HUNG et al., 2012; PENG et al., 2016). Ao mesmo tempo, outros

trabalhos relatam o contrário, com a condição de hipóxia interferindo negativamente na proliferação celular (HOLZWARTH et al., 2010; ZENG et al., 2011), dentre eles um estudo com CEM-TAh de Wang e colaboradores (2005). Ou seja, ainda não há um consenso na literatura, e provavelmente os resultados são em função da especificidade da linhagem celular e de cada condição de cultivo (RAFIQ, 2016).

Com base nisso, o primeiro experimento em biorreator (B₁) foi conduzido com 20% de OD, em seguida foi testado no B_2 uma situação de hipóxia com a concentração definida em 2%. Ficou claramente observado uma influência negativa da condição de hipóxia no rendimento celular das CEM-TAh, as células por vezes apresentavam um ritmo exponencial de crescimento, no entanto, a cada 120 h em proliferação, ocorria uma queda significativa na concentração celular, possivelmente ocasionada pela carência de oxigênio disponível para manter a nova concentração populacional. Assim, ao final das 506 h do cultivo B₂ o rendimento foi baixo, com um fator de proliferação máximo de 6,67 e a menor produtividade celular máxima dentre todas as situações experimentais. A partir dos resultados do B₂, a concentração de OD voltou para 20% no cultivo B₃, que apresentou o maior rendimento até então, porém com uma grande perda celular partir das 336 h de cultivo, possivelmente pela carência de oxigênio ou de nutrientes disponíveis para as células. Além disso, foi abundante neste cultivo em suspensão, a presença de grandes agregados de MC, inerentes ao cultivo em suspensão com MC, e que foram os maiores dentre todas as situações analisadas. Sendo assim, os cultivos B₄ e B₅ foram desenvolvidos com um inóculo inicial inferior (15:1) aos demais cultivos em biorreator, a fim de retardar a formação dos agregados de MC envoltos por matriz extracelular das células aderidas, além de uma concentração crescente de OD (20% das 0 a 96 h de cultivo, 30% das 96 as 168 h e 40% das 168 até as 216 h) que acompanhasse a demanda da proliferação celular em cultura, uma abordagem inédita na literatura.

Os resultados de ambas as situações não permitem afirmar que o maior rendimento celular alcançado pelos cultivos B_4 e B_5 na comparação com o mesmo período de até 216 h das condições B_1 a B_3 seja por conta do aumento gradativo da concentração de OD, tendo em vista que além da alteração deste parâmetro, ocorreu simultaneamente a redução do inóculo inicial e, por consequência, disponibilizou para as células uma concentração maior de nutrientes que pode ter contribuído para o maior rendimento dos cultivos na fase exponencial. No entanto, é possível observar que ao menos o aumento da concentração de OD não ocasionou

prejuízo à proliferação celular, em vista dos altos valores obtidos por ambos os cultivos. Já a diminuição do inóculo inicial foi eficiente em propiciar um menor perímetro no tamanho dos agregados, importante para o melhor rendimento e viabilidade celular, com a obtenção de valores as 216 h dos cultivos B_4 e B_5 inferiores a média das situações B_1 a B_3 as 168 h. Vale ressaltar que estes cultivos iniciaram com um inóculo maior e apresentavam até este momento uma concentração celular inferior aos experimentos B_4 e B_5 .

Tão importante quanto à definição de um protocolo otimizado para o cultivo de um tipo celular, neste caso, o cultivo de CEM-TAh em suspensão, é o monitoramento da integridade genômica das células em proliferação para atestar a segurança do bioprocesso na geração de células para terapia celular com maior potencial terapêutico e menor risco adverso. Portanto, o desafio na utilização de CEM para a terapia celular é contornar a falta de um número adequado de células devido à idade dos doadores, a senescência provocada nas CEM cultivadas ou sua combinação (KHADEMI-SHIRVAN et al., 2020). A senescência em função das sucessivas divisões das células em cultivo é mais um dentre outros fatores intrínsecos, como o ambiente metabólico do meio de cultura e a geração de ROS, e extrínsecos, relacionados ao ambiente que interage com a população celular, tais como o pH, temperatura, níveis de oxigênio, adesão celular e forças mecânicas (tensão de cisalhamento e hidrodinâmica) que contribuem para acelerar a senescência celular (TOWER, 2012). Apesar da relevância como testes genotóxicos e relativa facilidade na realização das técnicas básicas como o ensaio cometa que permite inferir a senescência celular a partir do grau de fragmentação do DNA (FUCHS et al., 2012) e do teste do micronúcleo para danos mutagênicos (OECD, 2016b) das CEM in vitro, a literatura é carente de estudos com esta abordagem. Desta forma, o presente trabalho é o primeiro a conciliar o objetivo de aperfeiçoar um bioprocesso para cultura de CEM-TAh em biorreator, levando-se em conta a integridade genômica das células cultivadas nos protocolos de proliferação.

Neste estudo, a fragmentação do material genético das CEM-TAh apontada pelo ensaio cometa foi período-dependente, ou seja, quanto maior o tempo das células em duplicação no sistema de cultura, maior a ocorrência de danos ao seu DNA, independente dos parâmetros de cultivo utilizados. Este perfil de resultado é condizente com relatos prévios da literatura realizados com CEM-TAh (ALT et al., 2012; FROELICH et al., 2013) e outros tipos de CEM (SCHALLMOSER et al., 2010;

FUCHS et al., 2012). As alterações genéticas comum em CEM senescentes, também são acompanhadas por diminuição da densidade, aumento de tamanho e perda da morfologia típica de forma fibroblastoide, podendo indicar um prejuízo na sua capacidade terapêutica (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005; BONAB et al., 2006; WAGNER et al., 2008). Alt e colaboradores (2012) inclusive demonstraram um menor potencial de auto-renovação e de diferenciação para as CEM-TAh cultivadas *in vitro* de doadores com idade mais avançada (>50 anos) comparada com doadores mais jovens (<20 anos), e relacionaram este resultado com as características senescentes da população celular, tais como a menor atividade da enzima telomerase que encurta os telômeros e a expressão anormal de genes relacionados ao controle do ciclo celular.

Embora o quadro de senescência celular possa prejudicar a capacidade proliferativa e de diferenciação das CEM-TAh, o mesmo estudo conduzido por Alt e colaboradores (2012) demonstrou que as células senescentes não ocasionaram a formação de tumores quando administradas sob o flanco de camundongos imunodeficientes mesmo após 120 dias de acompanhamento e com a expressão aumentada do gene p16^{INK4a} um indicador de senescência e com a menor expressão dos genes p53, e caspase 3, 8 e 9 relacionados a indução de apoptose. Segundo os autores, a senescência das CEM-TAh, indicada pelas maiores caudas no ensaio cometa, possuem relação com a expressão irregular de genes envolvidos com o reparo de quebras no DNA (APEX, XRCC4 e XRCC6).

Um indicador mais popular que o ensaio cometa para a avaliação da senescência replicativa em condições *in vitro* é a atividade de SA- β -Gal (Senescência Associada a β -Galactosidase). Este método permite determinar o potencial replicativo de populações celulares detectado histoquimicamente sob um pH 6. No entanto, sua utilização é aconselhável quando em conjunto com outros métodos de detecção de senescência (KHADEMI-SHIRVAN et al., 2020), podendo ser, com limitações, o ensaio cometa (FUCHS et al., 2012). Ao final dos cultivos B₄ e B₅ em biorreator, houve um discreto aumento na presença da coloração indicativa para a atividade enzimática da β -galactosidase comparativamente ao inóculo inicial. Este resultado nos sugere que apesar do ensaio cometa ter apresentado um dano crescente ao material genético das CEM-TAh em função do tempo em cultura, não podemos afirmar que isso se deva exclusivamente ao processo de senescência celular replicativa, ou seja, outros fatores endógenos e/ou exógenos podem estar

contribuindo de forma mais significativa para o grau de danos ao DNA revelado pelo ensaio genotóxico. A maior presença de células coradas para a enzima SA-β-Gal em função do aumento do número de passagens do cultivo já foi previamente descrito com CEM-TAh por Danoviz e colaboradores (2011). A SA-β-Gal também é um indicador da atividade lisossômica residual, que é detectado em células senescentes com o aumento do conteúdo de lisossomos (KURZ et al., 2000). Interessantemente a marcação imunofluorescente para viabilidade com LA/BE também revelou a abundância de lisossomos em algumas das CEM-TAh aderidas de forma período-dependente no citoplasma celular para todos os cultivos em biorreator. Com base no exposto, salienta-se a necessidade de análises complementares, tais como da atividade da telomerase, para poder inferir com maior precisão o grau de senescência das CEM-TAh em cultura.

A avaliação de micronúcleos (MN) também foi conduzida para demonstrar a integridade genômica das CEM-TAh após os cultivos B₄ e B₅ em biorreator. A presença de MN está associada à instabilidade genômica e a danos cromossômicos relevantes para os processos de imortalização e transformação maligna celular, que por sua vez afetam sua capacidade proliferativa (DANOVIZ et al., 2011). Neste estudo a frequência de MN aumentou para ambas as culturas após as 216 h de cultivo em biorreator, no entanto os valores foram inferiores ao do controle positivo e similares (p>0,05) ao do controle negativo realizado com as células do inóculo inicial. Embora critérios rígidos tenham sido seguidos, salienta-se que a identificação da morfologia nuclear é subjetiva e o volume dos MN não foi determinado por nenhum método quantitativo. Danoviz e colaboradores (2011) também detectaram a presença de MN em CEM-TAh cultivadas por longos períodos em cultura estática, no entanto a frequência de MN foi muito inferior quando comparado ao das CEM-TA de ratos, indicando uma maior resistência espécie-específico para a geração de danos mutagênicos.

De forma geral, a análise e validação das CEM-TAh por citometria de fluxo após o cultivo B_5 em biorreator e na comparação entre doadores distintos (A e B) em frasco *spinner* apresentaram, para os diferentes marcadores, valores compatíveis àqueles preconizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* – ISCT) (DOMINICI et al., 2006). Os marcadores positivos estiveram presentes em mais de 98% das CEM-TAh, enquanto que os negativos estiveram abaixo do máximo recomendado de 2% do total de células. As CEM-TAh dos cultivos B₁ a B₅ e dos doadores A e B também comprovaram sua característica mesenquimal pela diferenciação adipogênica e osteogênica. Em conjunto, estes resultados de identidade celular auxiliam no entendimento de que apesar do relativo grau de danos ao material genético das células cultivadas na plataforma de cultura em suspensão em biorreator, houve a capacidade de manutenção das características recomendadas pela ISCT, ou seja, as células utilizadas nos diferentes experimentos deste estudo foram de fato CTM, neste caso, derivadas de tecido adiposo humano, e tornam-se aptas para avaliações posteriores que poderiam envolver aplicações terapêuticas experimentais para avaliação do potencial regenerativo em diferentes patologias.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a condução de uma investigação detalhada acerca da manipulação de CEM-TAh em diferentes plataformas de cultivo. Partindo da cultura estática, até a proliferação em larga escala em biorreator, foi possível acompanhar a influência de diversos parâmetros no rendimento celular, conciliando com a viabilidade ao longo do cultivo, o metabolismo e a integridade genômica de células com potencial terapêutico. Resumidamente, o presente trabalho permite concluir que:

- a) O volume de meio tem pouca influência sobre a cultura estática. Podendose adotar o volume de 5 mL para frascos-T de 25 cm² com 50% de renovação de meio a cada 48 h;
- b) O cultivo em frasco spinner com CEM-TAh pode ocorrer com o seguinte protocolo: concentração celular inicial de 30:1 (2,4 x 10⁴ células/mL), regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, 10% de SFB no meio de cultura com renovação de 50% do meio a cada 72 h, microcarregador Cultispher-S em 1 g/L e velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa.
- c) A melhor situação de cultivo em biorreator tipo tanque com agitação foi desenvolvida pelo cultivo experimental B₅, cujos parâmetros foram definidos gradativamente a partir da execução dos experimentos anteriores, sendo assim: concentração celular inicial de 15:1 (1,2 x 10⁴ células/mL), regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, 10% de SFB no meio de cultura com renovação de 25% do meio a cada 48 h, velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa, pH 7,3, temperatura a 36,5° C, microcarregador Cultispher-S em 1 g/L e concentração de oxigênio dissolvido crescente de 20 a 40% (ajuste de 10% a cada 72 h a partir das 96 h).

O trabalho enfim demonstra que um cultivo celular pode ser otimizado, servindo adiante como base metodológica para novos estudos aprofundados com o uso de CEM-TAh em suspensão. Além disso, insere no protocolo e recomenda as avaliações genotóxicas como forma de se atestar uma mínima confiabilidade necessária à utilização das células proliferadas em larga escala para terapia celular.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados do presente estudo contribuem significativamente com a literatura referente ao cultivo de CEM-TAh em diferentes plataformas. A partir dos resultados alcançados abre-se a perspectiva de investigação mais profunda em alguns aspectos do cultivo celular em larga escala para fins de maior conhecimento das CEM-TAh e sua biossegurança para uso na terapia celular. Como sugestões de trabalhos futuros, podem ser citados:

- A inclusão da análise de hibridização in situ para avaliação do encurtamento dos telômeros, além da imunomarcação e detecção de anticorpos que atestam a morte ou senescência celular;
- b. A proliferação em larga escala de CEM-TAh seguido de sua aplicação em modelo animal para avaliação do potencial terapêutico e teratogênico da linhagem celular envelhecida pelo cultivo extensivo;
- c. O desenvolvimento de um sistema de monitoramento em tempo real da cinética de proliferação, viabilidade e identidade das CEM-TAh em cultivo. A inclusão de um sensor que realizasse uma leitura constante dos níveis metabólicos do meio de cultura que combinada com correlações matemáticas e inteligência artificial, poderia estimar a população celular, seu tempo de duplicação, viabilidade e senescência;
- d. O cultivo das CEM-TAh em condições totais de boas práticas de manufatura (ausente de SFB ou enzimas de origem animal) para aplicação terapêutica desde que ocorra o acompanhamento citogenético das células cultivadas a fim de controlar o envelhecimento da população celular;
- e. A comparação da atual metodologia definida para o cultivo de CEM-TAh em biorreator tipo tanque agitado com células provenientes de doadores de sexo e idade distintos, tendo em vista que o atual estudo foi individual.
- f. Cultivo direto das CEM-TAh. As células extraídas do tecido seriam diretamente incluídas no sistema de cultivo em suspensão com MC sem passar pela tripsinização da cultura estática ou pela criopreservação.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, Bruce et al. Fundamentos de biologia celular: Uma introdução à biologia molecular da célula. Artmed, 2002. JUNQUEIRA, LC, CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2005.

ALT, Eckhard U. et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. **Stem cell research**, v. 8, n. 2, p. 215-225, 2012.

ALTANEROVA, V. et al. Genotoxic damage of human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells triggers their terminal differentiation. **Neoplasma**, v. 56, n. 6, p. 542, 2009.

ARALDI, R. P. et al. Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. **BioMed research international**, v. 2013, n. 5, p. 1-7, 2013a.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. Análise do potencial mutagênico dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) e da l-carnitina mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 6, p. 448-451, 2013b.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. Mutagenic potential of Cordia ecalyculata alone and in association with Spirulina maxima for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. **Genetics and molecular research**, p. 5207-5220, 2014.

ARIAS, M. E.; FELMER, Ricardo. Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 41, n. 3, p. 185-195, 2009.

AROCA, Ricardo. Surface-enhanced vibrational spectroscopy. John Wiley & Sons, 2006.

AUGUSTO, Elisabeth FP et al. Nomenclature and guideline to express the amount of a membrane protein synthesized in animal cells in view of bioprocess optimization and production monitoring. **Biologicals**, v. 38, n. 1, p. 105-112, 2010.

AZQUETA, Amaya; COLLINS, Andrew R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949-968, 2013.

BAPTISTA, Julia et al. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 4, p. 927-936, 2008.

BONAB, Mandana Mohyeddin et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC** cell biology, v. 7, n. 1, p. 14, 2006.

BONASSI, Stefano et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BURHANS, William C.; WEINBERGER, Martin. DNA replication stress, genome instability and aging. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 22, p. 7545-7556, 2007.

BYDLOWSKI, Sergio P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.

CAO, Xiaoguang et al. The effects of quercetin in cultured human RPE cells under oxidative stress and in Ccl2/Cx3cr1 double deficient mice. **Experimental eye research**, v. 91, n. 1, p. 15-25, 2010.

CARMELO, Joana G. et al. Scalable ex vivo expansion of human mesenchymal stem/stromal cells in microcarrier-based stirred culture systems. In: Stem Cells and Good Manufacturing Practices. **Humana Press**, New York, NY, 2014. p. 147-159.

CARMELO, Joana G. et al. A xeno-free microcarrier-based stirred culture system for the scalable expansion of human mesenchymal stem/stromal cells isolated from bone marrow and adipose tissue. **Biotechnology journal**, v. 10, n. 8, p. 1235-1247, 2015.

CARUSO, Sâmia R. et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 4, p. 889-895, 2014.

ÇELIK, Ayla et al. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. **DNA and cell biology**, v. 33, n. 3, p. 148-154, 2014.

CHARAMES, George S.; BAPAT, Bharati. Genomic instability and cancer. **Current molecular medicine**, v. 3, n. 7, p. 589-596, 2003.

CHEN, Allen Kuan-Liang; REUVENY, Shaul; OH, Steve Kah Weng. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 7, p. 1032-1046, 2013.

CHEN, Allen Kuan-Liang et al. Increasing efficiency of human mesenchymal stromal cell culture by optimization of microcarrier concentration and design of medium feed. **Cytotherapy**, v. 17, n. 2, p. 163-173, 2015.

CHOI, Ji Suk et al. In vitro expansion of human adipose-derived stem cells in a spinner culture system using human extracellular matrix powders. **Cell and tissue research**, v. 345, n. 3, p. 415, 2011.

CLINICAL TRIALS. Disponível em: https://clinicaltrials.gov>. Acesso em 22 de janeiro de 2020.

COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

CORNÉLIO, Déborah Afonso et al. Cytokinesis-block micronucleus assay adapted for analyzing genomic instability of human mesenchymal stem cells. **Stem cells and development**, v. 23, n. 8, p. 823-838, 2014.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, Elva I. et al. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

COVAS, D. T.; ZAGO, M. A. Células-Tronco: A nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, p. 3-130, 2006.

CUENCA, Jimena et al. The reparative abilities of menstrual stem cells modulate the wound matrix signals and improve cutaneous regeneration. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 464, 2018.

CUNHA, Bárbara et al. Bioprocess integration for human mesenchymal stem cells: from up to downstream processing scale-up to cell proteome

characterization. Journal of biotechnology, v. 248, p. 87-98, 2017.

D'ANDREA, Francesco et al. Large-scale production of human adipose tissue from stem cells: a new tool for regenerative medicine and tissue banking. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 14, n. 3, p. 233-242, 2008.

DANOVIZ, Maria Elena et al. Adipose tissue–derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. **Stem cells and development**, v. 20, n. 4, p. 661-670, 2011.

DARIOLLI, Rafael et al. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

DE FRANCESCO, Francesco et al. Human adipose stem cells: from bench to bedside. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 6, p. 572-584, 2015.

DING, Huifen et al. Establishment of 3D culture and induction of osteogenic differentiation of pre-osteoblasts using wet-collected aligned scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 222-230, 2017.

DOMINICI, M. L. B. K. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOS SANTOS, Francisco et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 1116-1127, 2014.

EAKER, Shannon et al. Bioreactors for cell therapies: current status and future advances. **Cytotherapy**, v. 19, n. 1, p. 9-18, 2017.

ELSEBERG, Christiane L.; SALZIG, Denise; CZERMAK, Peter. Bioreactor expansion of human mesenchymal stem cells according to GMP requirements. In: **Stem Cells and Good Manufacturing Practices**. Humana Press, New York, NY, p. 199-218, 2014.

ELSEBERG, Christiane L. et al. The challenge of human mesenchymal stromal cell expansion: current and prospective answers. **New Insights into Cell Culture**

Technology. Intech, Chapter 3, p. 100-134, 2017.

ERIDANI, Sandro. Types of human stem cells and their therapeutic applications. **Stem Cell Discovery**, v. 2014, 2014.

ESTRADA, J. C. et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 5, p. 743-755, 2012.

FEHRER, Christine; LEPPERDINGER, Günter. Mesenchymal stem cell aging. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 12, p. 926-930, 2005.

FELIX, Renato Gonçalves et al. Rat mesenchymal stem cells from adipose tissue reduce bleomycin-induced lung remodeling in late stage. **Stem Cell Discovery**, v. 6, n. 01, p. 24, 2016.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, Michael; MORLEY, Alec. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, v. 43, n. 172-173, p. 233-246, 1985.

FERNANDES-PLATZGUMMER, Ana et al. Maximizing mouse embryonic stem cell production in a stirred tank reactor by controlling dissolved oxygen concentration and continuous perfusion operation. **Biochemical engineering journal**, v. 82, p. 81-90, 2014.

FERNANDES-PLATZGUMMER, Ana et al. Clinical-grade manufacturing of therapeutic human mesenchymal stem/stromal cells in microcarrier-based culture systems. In: **Mesenchymal Stem Cells**. Humana Press, New York, NY, p. 375-388, 2016.

FOLLMAR, K. E. et al. Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells. **Tissue engineering**, v. 12, n. 12, p. 3525-3533, 2006.

FORESTELL, Sean P. et al. Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 39, n. 3, p. 305-313,

1992.

FRASER, John K. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 150-154, 2006.

FRAUENSCHUH, Simone et al. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 1, p. 187-193, 2007.

FROELICH, Katrin et al. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid singlestrand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro. **Cytotherapy**, v. 15, n. 7, p. 767-781, 2013.

FUCHS, Robert et al. Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. **Cell biology international**, v. 36, n. 1, p. 113-117, 2012.

FUOCO, Natalia Langenfeld et al. Proposição de uma nova metodologia para isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies, v. 8, n. 1, 2016.

GODSCHALK, Roger WL et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 757, n. 1, p. 60-67, 2013.

GRAYSON, Warren L. et al. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 358, n. 3, p. 948-953, 2007.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HERMETO, L. C. et al. Evaluation of pH effects on genomic integrity in adiposederived mesenchymal stem cells using the comet assay. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 339-348, 2015.

HEUSER, Vanina Dahlström et al. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood

cells. Cell biology international, v. 32, n. 10, p. 1223-1229, 2008.

HEWITT, Christopher J. et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 11, p. 2325, 2011.

HINKAL, George W. et al. Altered senescence, apoptosis, and DNA damage response in a mutant p53 model of accelerated aging. **Mechanisms of ageing and development**, v. 130, n. 4, p. 262-271, 2009.

HOLZWARTH, Christina et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. **BMC cell biology**, v. 11, n. 1, p. 11, 2010.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HUNG, Shun-Pei et al. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 2, p. 260-266, 2012.

HUNSBERGER, Joshua G. et al. Five critical areas that combat high costs and prolonged development times for regenerative medicine manufacturing. **Current Stem Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 77-82, 2017.

HUPFELD, Julia et al. Modulation of mesenchymal stromal cell characteristics by microcarrier culture in bioreactors. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 11, p. 2290-2302, 2014.

ISMADI, Mohd-Zulhilmi; HOURIGAN, Kerry; FOURAS, Andreas. Experimental characterisation of fluid mechanics in a spinner flask bioreactor. **Processes**, v. 2, n. 4, p. 753-772, 2014.

JOSSEN, Valentin et al. Theoretical and practical issues that are relevant when scaling up hMSC microcarrier production processes. **Stem cells international**, v. 2016, 2016.

KAISER, Stephan et al. Fluid flow and cell proliferation of mesenchymal adipose-derived stem cells in small-scale, stirred, single-use bioreactors. **Chemie**

Ingenieur Technik, v. 85, n. 1-2, p. 95-102, 2013.

KERN, Susanne et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KHADEMI-SHIRVAN, Maliheh et al. The Importance of Stem Cell Senescence in Regenerative Medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 1-16, 2020.

KIRSCH-VOLDERS, Micheline et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003.

KURZ, David J. et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **Journal of cell science**, v. 113, n. 20, p. 3613-3622, 2000.

LAMBERT, A. P. F. et al. The Role of DNA Damage and Repair Proteins in Adipose-Derived Adult Stem Cell Differentiation in Neural-Like Cells. **J Tissue Sci Eng**, v. 2, n. 109, p. 2, 2011.

LAWSON, Tristan et al. Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50 L single-use stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 49-62, 2017.

LEME, Jaci et al. A multivariate calibration procedure for UV/VIS spectrometric monitoring of BHK-21 cell metabolism and growth. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 1, p. 241-248, 2014.

LIN, Ching-Shwun; LIN, Guiting; LUE, Tom F. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. **Stem cells and development**, v. 21, n. 15, p. 2770-2778, 2012.

MA, Teng; TSAI, Ang-Chen; LIU, Yijun. Biomanufacturing of human mesenchymal stem cells in cell therapy: influence of microenvironment on scalable expansion in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 108, p. 44-50, 2016.

MARCELINO, Mônica Yonashiro et al. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 35, n. 1, p. 20-27, 2015.

MELTON, Douglas. 'Stemness': definitions, criteria, and standards. In: **Essentials of stem cell biology**. Academic Press, p. 7-17, 2014.

MILLER, Beate et al. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, p. 45-59, 1997.

MILLER, Beate et al. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 410, n. 1, p. 81-116, 1998.

MIZUKAMI, Amanda; SWIECH, Kamilla. Mesenchymal stromal cells: from discovery to manufacturing and commercialization. **Stem cells international**, v. 14, p. 141-143, 2018.

MIZUNO, Hiroshi; TOBITA, Morikuni; UYSAL, A. Cagri. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. **Stem cells**, v. 30, n. 5, p. 804-810, 2012.

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

NIENOW, Alvin W. Reactor engineering in large scale animal cell culture. **Cytotechnology**, v. 50, n. 1-3, p. 9, 2006.

NIH.NationalInstitutesofHealth.Disponívelem:<https://stemcells.nih.gov/info/basics/2.htm>.Acesso em 22 de janeiro de 2020.

NILSSON, Kjell. Microcarrier cell culture. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 6, n. 1, p. 404-439, 1988.

NORPPA, Hannu; FALCK, Ghita C.-M. What do human micronuclei

contain?. Mutagenesis, v. 18, n. 3, p. 221-233, 2003.

NÚNEZ, Eutimio Gustavo Fernández et al. Influence of aeration-homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism. **Cytotechnology**, v. 66, n. 4, p. 605-617, 2014.

OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **OECD Publishing**. Disponível em: https://doi.org/10.1787/9789264264885-em>. 2016a

OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **OECD Publishing**. Disponível em: https://doi.org/10.1787/9789264264762-em>. 2016b

ONG, Wee Kiat; SUGII, Shigeki. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 6, p. 1083-1086, 2013.

OSTLING, 65O; JOHANSON, Karl J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PANCHALINGAM, Krishna M. et al. Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. **Stem cell research & therapy**, v. 6, n. 1, p. 225, 2015.

PASSOS, João F.; VON ZGLINICKI, Thomas. Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers?. **Free radical research**, v. 40, n. 12, p. 1277-1283, 2006.

PENG, Longying et al. Effects of hypoxia on proliferation of human cord bloodderived mesenchymal stem cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1615-1622, 2016.

PETIOT, Emma et al. In situ quantification of microcarrier animal cell cultures using near-infrared spectroscopy. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1427-1431, 2010.

PETTERSSON, Sofia. Biodegradable gelatin microcarriers in tissue engineering: In vitro studies on cartilage and bone. Tese de Doutorado.

Linköping University Electronic Press, 2009.

PFEIFFER, Petra; GOEDECKE, Wolfgang; OBE, Günter. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289-302, 2000.

PFRAGNER, Roswitha et al. Establishment and characterization of three novel cell lines-P-STS, L-STS, H-STS-derived from a human metastatic midgut carcinoid. **Anticancer research**, v. 29, n. 6, p. 1951-1961, 2009.

RAFIQ, Qasim A.; COOPMAN, Karen; HEWITT, Christopher J. Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: current technologies and future challenges. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 8-16, 2013.

RAFIQ, Qasim A. Toward a scalable and consistent manufacturing process for the production of human MSCs. **Cell and Gene Therapy Insights**, v. 2, n. 1, p. 127-140, 2016.

RODRIGUES, Carlos AV et al. Stem cell cultivation in bioreactors. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 815-829, 2011.

ROSA, Filipa et al. Monitoring the ex-vivo expansion of human mesenchymal stem/stromal cells in xeno-free microcarrier-based reactor systems by MIR spectroscopy. **Biotechnology progress**, v. 32, n. 2, p. 447-455, 2016.

RUBIN, J. Peter et al. Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 120, n. 2, p. 414-424, 2007.

SALES, Kevin C. et al. In situ near-infrared (NIR) versus high-throughput mid-infrared (MIR) spectroscopy to monitor biopharmaceutical production. **Applied spectroscopy**, v. 69, n. 6, p. 760-772, 2015.

SAMANTA, Swapan; DEY, Pranab. Micronucleus and its applications. **Diagnostic cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2012.

SANTOS, Francisco dos et al. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 12, p. 1201-1210, 2011.

SCHALLMOSER, Katharina et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. **Haematologica**, v. 95, n. 6, p. 867-874, 2010.

SCHIRMAIER, Carmen et al. Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 3, p. 292-303, 2014.

SCHOP, D. et al. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 2, n. 2-3, p. 126-135, 2008.

SCHOP, Deborah et al. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 8, p. 1877-1886, 2009.

SCHOP, D. et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 4, n. 2, p. 131-140, 2010.

SCHRAML, Elisabeth et al. Acute adrenergic stress inhibits proliferation of murine hematopoietic progenitor cells via p38/MAPK signaling. **Stem cells and development**, v. 18, n. 2, p. 215-228, 2009.

SHAKOORI, Abdul Rauf; AHMAD, Aftab. Cytotoxic and genotoxic effects of arsenic and lead on human adipose derived mesenchymal stem cells (AMSCs). **Journal of stem cells & regenerative medicine**, v. 9, n. 2, p. 29, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental, 2009. **Boockman**, v. 60, p. 295-312.

SIMÃO, Vinícius Augusto et al. Metabolic and proliferation evaluation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells (ASC) in different culture medium volumes: standardization of static culture. **Biologicals**, v. 62, p. 93-101, 2019.

SIMARIA, Ana S. et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: Single-use cell expansion technologies. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 69-83, 2014.

SINGH, Narendra P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA

damage in individual cells. Experimental cell research, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

STESSUK, Talita et al. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 7, p. 511-520, 2016.

STESSUK, Talita et al. A topical cell therapy approach for diabetic chronic ulcers: Effects of mesenchymal stromal cells associated with platelet-rich plasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 2020.

SWAPAN, S.; DEY, P. Micronucleus and Its Applications. **Diagnostic** cytopathology, v. 40, n. 1, p. 84–90, 2010.

TAN, Kah Yong et al. Serum-free media formulations are cell line–specific and require optimization for microcarrier culture. **Cytotherapy**, v. 17, n. 8, p. 1152-1165, 2015.

TAVASSOLI, Hossein et al. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: a biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. **Biomaterials**, v. 181, p. 333-346, 2018.

TEMPLE, Sally; SHEN, Qin; GODERIE, Susan K. Method for stimulating selfrenewal of neural stem cells and enhancing neurogenesis. U.S. Patent n. 7,901,936, 8 mar. 2011.

TICE, Raymond R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOWER, John. Stress and stem cells. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, v. 1, n. 6, p. 789-802, 2012.

TOZETTI, Patrícia Aparecida et al. Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 5, p. 1358-1367, 2017.

VAN DER SANDEN, Boudewijn et al. Optimizing stem cell culture. Journal of

cellular biochemistry, v. 111, n. 4, p. 801-807, 2010.

VILLAS BOAS, Gustavo Roberto et al. Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade e dos efeitos antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico dos frutos da Campomanesia pubescens (DC) O. BERG em ratos. 2018. 239 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.

VOJINOVIĆ, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Real-time bioprocess monitoring: Part I: In situ sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 114, n. 2, p. 1083-1091, 2006.

WAGNER, Wolfgang et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. **PloS one**, v. 3, n. 5, 2008.

WAGNER, Wolfgang et al. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells?. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 4, p. 224, 2010.

WAN KAMARUL ZAMAN, Wan Safwani et al. Long-term in vitro expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumourigenicity. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 8, n. 1, p. 67-76, 2014.

WANG, David W. et al. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. **Journal of cellular physiology**, v. 204, n. 1, p. 184-191, 2005.

WILSON III, David M.; BOHR, Vilhelm A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. **DNA repair**, v. 6, n. 4, p. 544-559, 2007.

YU, Claire et al. Decellularized adipose tissue microcarriers as a dynamic culture platform for human adipose-derived stem/stromal cell expansion. **Biomaterials**, v. 120, p. 66-80, 2017.

YUAN, Yifan et al. Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 8, n. 3, p. 210-225, 2014.

ZENG, Hui-Lan et al. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **BMC cell**

biology, v. 12, n. 1, p. 32, 2011.

ZHENG, Jie et al. Differential patterns of apoptosis in response to aging in Drosophila. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 34, p. 12083-12088, 2005.

ZUK, Patricia A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ZUK, Patricia A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo publicado proveniente dos experimentos com cultura estática.

Biologicals 62 (2019) 93-101



Metabolic and proliferation evaluation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells (ASC) in different culture medium volumes: standardization of static culture

Vinícius Augusto Simão^a, Caetano Pedro Evangelista-Ribeiro^b, Heloisa Brand^b Lougan Lagass-Pereira^c, Laís Fernanda Marques^a, Pedro Henríque Benites-Aoki^b, Roseli Nunes da Silveira-Antunes^d, Aldo Tonso^e, João Tadeu Ribeiro-Paes^{b,*}

^a School of Medicine, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b School of Sciences, Humanities and Languages, São Paulo State University (UNESP), 19806-900, Assis, SP, Brazil ^c Biomedical Science Institute, University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^d School of Medicine of Marilia, Hemocenter, 17519-050, Marilia, SP, Brazil

e Polytechnic School, University of São Paulo, 05508-010, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords: Stem cells Standard cultivation Kinetic evaluation Medium composition Biochemical analysis FT-IR

ABSTRACT

Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells (ASC) have acquired a prominent role in tissue engineering and regenerative medicine. However, the standardization of basic culture procedures in this cellular type is still not well established according to the main gualitative cellular attributes. We evaluate the cell growth profile of human ASC in a different culture medium volumes and their nutritional composition utilizing static cultivation. Culture medium volumes (5, 10 and 15 mL/25 cm²) in T-flasks were evaluated by kinetic parameters and the metabolic composition was determined by biochemical analysis and Fourier transform infrared (FT-IR) absorption spectroscopy. 50% renewal of culture medium volume every 48 h was adopted. Immunophenotypic characterization and cell differentiation were performed. There was no difference (p > 0.05) in the kinetic parameters of cell proliferation between the culture medium volumes or in FT-IR composition. However, the concentrations of glucose, glutamine, lactate, and glutamate varied significantly during the cultivation process as a function of the medium volume. ASC presented specific antigens and differentiation potential of mesenchymal stromal/stem cells. It was concluded that the minimal culture medium volume (5 mL/25 cm² in static culture) was sufficient to maintain the stability, potency, and growth of ASC, representing an economic and safe standardization for this cell culture process.

1. Introduction

The mesenchymal stromal/stem cells (MSC) have been considered a promising therapeutic alternative in several preclinical and clinical studies [1-9]. The great interest in MSC is associated with a series of characteristics that makes them an excellent alternative in tissues and regenerative medicine. Among these, we can mention: MSCs can be isolated from different kinds of tissues and show a low expression of histocompatibility antigens (HLA), which make feasible the use of this cellular type in autologous and allogeneic transplants [10,11].

The use of adipose tissue as a source of MSC was proposed, for the

first time, in 2001, by Zuk et al. [12] Since then, adipose tissue has been widely used as an important source for isolation and proliferation of MSC. This is due to the great availability of adipose tissue, which can be obtained through less invasive procedures [13,14]. Also, adipose-derived mesenchymal stromal cells (ASC) have high proliferation potential [15,16].

Considering these aspects, the ASC has acquired a prominent role in tissue engineering and regenerative medicine (TERM). In this context, there is an extensive literature on the use of ASC in preclinical studies in animal models and clinical protocols on different types of degenerative diseases in human patients [4,7,13,17-21]. However, there are some

lougan@usp.br (L. Lagass-Pereira), lais_nina19@gmail.com (L.F. Marques), pedro.aoki@assis.unesp.br (P.H. Benites-Aoki), roseliantunes.ra@gmail.com (R. Nunes da Silveira-Antunes), atonso@usp.br (A. Tonso), ribeiro.paes@unesp.br (J.T. Ribeiro-Paes).

https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.08.006

Available online 06 September 2019

^{*} Corresponding author. São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Department of Biotechnology, Laboratory of Genetics and Cell Therapy, GenTe Cel, Avenue Dom Antonio, 2100, Assis, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: vinicussimao@usp.br (V.A. Simão), caetano.ribeiro1@gmail.com (C.P. Evangelista-Ribeiro), heloisabrand@hotmail.com (H. Brand),

Received 25 November 2018; Received in revised form 1 July 2019; Accepted 20 August 2019

^{1045-1056/ © 2019} Published by Elsevier Ltd on behalf of International Alliance for Biological Standardization.

V.A. Simão, et al.

aspects of the ASC cultivation methodology that still need to be better defined and standardized.

Among the key challenges of MSC proliferation and harvest technologies are the retention of the main qualitative cellular attributes related to identity, potency, genetic stability, and safety [22]. Thus, the greatest effort in this regard was recently directed to the definition of the culture conditions, as medium composition and the metabolic monitoring and control of the culture to maintain the homeostasis conditions [8,23,24].

Biochemical methods, spectroscopic and multivariate analysis have also been simultaneously used to provide information on different variables of a bioprocess, including the culture medium composition and the number of cells [24–26]. Among spectroscopic techniques, Fourier transform infrared (FT-IR) absorption analysis is a promising physicochemical technology for monitoring changes in biological samples and has been extensively explored in mammalian cells culture analysis [27,28]. The FT-IR technique measures molecular vibrations, making it highly suitable for the detection of different compounds (e.g., proteins, polysaccharides) including the different medium components that allow the understanding of the cell growth and medium component consumption [29].

In this context, for standardization purposes, the objective of this study is to evaluate the ASC cell proliferation potential seeking to correlate different parameters of analysis such as the maximum specific growth rate, the biochemical composition of the medium and the concentration of metabolites within different culture medium volumes in static cultivations in T-flasks.

2. Methodology

2.1. Collection and conditioning of adipose tissue

MSCs were obtained from human adipose tissue from a healthy donor submitted to the abdominal dermolipectomy procedure performed in an aesthetic surgery clinic in Assis, SP, Brazil. The patient after informed about the research agreed to sign a free and informed consent term authorizing the use of your biological material. The adipose tissue obtained was incubated with phosphate buffer (PBS), pH 7.2 (13-30258-05, LGC Biotechnology, Cotia, Brazil), supplemented with 2% antibiotic-antimycotic (15240–062, Gibco, New York, USA) for disinfection (2 h at room temperature).

2.2. Isolation and culture of adipose-derived mesenchymal stromal cells

After the disinfection period, 100 g of adipose tissue were fragmented and subjected to enzymatic digestion with 0.25% collagenase type I (17018–029, Gibco, New York, USA). The suspension obtained was incubated at 37 °C for 1 h. The enzyme was neutralized by the addition of alpha modified eagle medium (α MEM) (BR30007-05, LGC Biotechnology, Cotia, Brazil) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (10Bio500, LGC Biotechnology, Cotia, Brazil). The material was filtered (70 µm filter) for the separation of tissue debris. The resulting cell suspension was centrifuged for 5 min at 900 G and the precipitate was resuspended in the culture medium. Cells obtained were seeded in 25 cm² T-flasks in α MEM culture medium supplemented with 1% antibiotic-antimycotic (15240–062, StemPro from Gibco, New York, USA) and 10% FBS. The cells were maintained in an incubator at 36.5 °C and 5% CO₂.

2.3. Primary culture

Fresh cell culture medium was supplied every 48 h. At 70–80% confluence, the cells were trypsinized (0.25% Trypsin-EDTA, 25200-072-StemPro from Gibco, New York, USA) and the cell density was obtained by counting of viable cells using Trypan Blue. Cultures were maintained in proliferation in static culture flasks (25 cm^2 T-flasks)

Biologicals 62 (2019) 93-101

until the first passage.

2.4. Experimental culture for evaluation of cell proliferation kinetics

ASC obtained from the primary culture after the first passage was transferred to 25 cm^2 T-flasks at an initial cell density of 3.000 cells/cm [2]. In this culture system, it was evaluated the effect of the culture medium volume (5, 10 or 15 mL) on the kinetic parameters of maximum specific growth rate [µmax (h⁻¹)], maximum cell concentration [Xmax (cells.cm⁻²")] and cell productivity [II (cells x cm⁻² h⁻¹)] over 8 days of culture. Fifty percent of the culture medium was changed every 48 h.

Each experimental group (5, 10 or 15 mL of culture medium) was composed of twenty-four 25 cm^2 T-flasks divided into triplicates for each day of culture (1st to 8th). At the end of each day, an amount of triplicate samples of each experimental group were used to obtain the cell density and viability of each flask/group and the culture medium aliquots for metabolic analysis and FT-IR spectroscopy.

2.5. Analysis of the cell proliferation kinetics

The specific growth rate (μ_x) was determined by Equation (1), where *X* represents the cell concentration obtained by counting in Neubauer's chamber, and dX/dt, the proliferation rate in the culture system. The maximum specific growth rate (μ_{max}) was measured at the logarithmic growth stage, where the value is constant, and determined from a linear regression between the natural logarithm of the cellular concentrations (ln[cells/cm²]) and the time of cultivation [30]. The value of μ_{max} was obtained using the angular coefficient of the linear equation in this region of the curve. The coefficient was also used to determine the doubling time t_d (or generation time) (Equation (2)).

The maximum cell productivity (Π_{max}), which expresses a relationship between the rate of cell production from the initial instant (X_i) to the point with maximum cell concentration (X_{max}) and the culture interval required to reach the stipulated amount (Δt), is given by Equation (3):

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \tag{1}$$

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

$$\Pi = \frac{X_{max} - X_i}{\Delta t_{i_i \rightarrow t_{max}}}.$$
(3)

2.6. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy analyses

The acquisition of the culture medium spectra was performed in a Fourier transform infrared (FT-IR) analyzer (Bruker Optics, Inc., Bruker Tensor 27, Billerica, MA, USA). The measurements were carried out using the transmission mode on Germanium substrates. The samples were prepared by dropping 500 μ L of the culture medium separately from each T-flask (triplicate/day/culture medium volume) into the substrates, which were further placed under vacuum for the water evaporation. FT-IR spectra were collected in triplicate within the spectral range of 400–4000 cm⁻¹ with 128 scans and spectral resolution of 4 cm⁻¹. A single spectrum of the culture medium before inoculating each experimental situation was performed to be used as a reference. [31,32].

2.7. Biochemical analysis of nutrients and metabolites

The concentration of nutrients and metabolites presents throughout the cultivation process under different experimental conditions was determined by collecting 1 mL of culture medium separately from each T-flask (triplicate/day/culture medium volume), then the samples were centrifuged at 750 G for 4 min. Subsequently, the supernatant was filtered through a filter unit with a pore diameter of $0.22 \,\mu$ m and frozen at -20 °C until the biochemical analyze of nutrients or metabolites. The concentrations of glucose, lactate, glutamine, and glutamate (mM) were measured in duplicate using a biochemical analyzer with the use of enzymatic reactions coupled to an electrochemical detector [YSI 2700 - Select Bioanalyzer (YSI Life Sciences, OH, USA)] [33].

2.8. Immunophenotyping analysis

The immunophenotypic analysis of the surface markers was performed in a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA). For this, at the end of the 8th day of culture, a total cell density of 3.7×10^5 obtained by dissociation of the static culture from the triplicate of each experimental group (an 1.2×10^5 cells contribution per group) was maintained to proliferate in second passage in 175 cm² Tflasks to obtain a viable cell concentration of 4×10^6 required for the immunophenotypic assays. After this, the cells were analyzed by flow cytometry using the antibodies anti-CD34 (555822), anti-CD45 (555483), anti-CD73 (561254), anti-CD90 (555595), anti-CD105 (561443) and human leukocyte antigen (HLA)-DR (347364) (Becton Dickinson Pharmigen, New Jersey, USA). The cells were incubated with the monoclonal antibodies following the manufacturer's protocol. Isotype controls were also prepared for each experiment. 10.000 events were analyzed for each sample. For data acquisition and analysis, the software Cell Quest and Paint a Gate (Becton Dickinson Pharmigen, New Jersey, USA) were used.

2.9. In vitro differentiation in chondrogenic, osteogenic, and adipogenic lines

In order to analyze the in vitro potential for differentiation of ASC into mesodermal lineages, part of the cells obtained by dissociation at the end of 192 h of culture in each experimental group were seeded in 175 cm^2 T-flasks in a total cell density of 3.7×10^5 to obtain a viable cell concentration in second passage necessary to the in vitro differentiation protocols. After this, 6-well plates were seeded following the specific protocol of the kits: chondrogenic (A10071-01), osteogenic (A10072-01) and adipogenic (A10070-01) (StemPro from Gibco, New York, USA). The cells were maintained in culture for 14 days recommended by the manufacturer and the differentiations were confirmed using Alcian Blue (chondrogenic), Alizarin Red S (osteogenic) or Oil Red O (adipogenic) dyes. Cell culture images were captured with a camera coupled to the inverted light optic microscope (Tucsen, China) using the ISCapture Professional Imaging Software program (Tucsen, Fujian, China). Controls for cell differentiation were cultured and stained under the same conditions and subjected to the same medium exchange routine, except that the cells were cultured only with culture medium.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA), and non-parametrical analyses of ANOVA – Kruskal Wallis considering the level of significance (α) equal to 0.05.

2.11. Ethical aspects

The study was approved by the Research Ethics Committee (São Paulo State University – UNESP – Assis, SP, Brazil) and registered at Plataforma Brasil (CAAE: 58107716.0.0000.5401 - September 28, 2016). Donor of adipose tissue was aware of the purpose of the research and agreed to sign the informed consent form.

Biologicals 62 (2019) 93-101



Fig. 1. A comparative profile of ASC growth as a function of different culture medium volumes in static culture. In all groups, the presence of different growth phases was observed throughout the growing time. Among the different concentrations of culture medium, the 5 mL group started the logarithmic phase after the period of the lag phase of 24 h, which lasted until 72 h and 48 h in the 10 and 15 mL respectively. The highest cell concentration was obtained in the plateau phase with 192 h of cultivation in the 10 mL group of medium (p > 0.05). The plateau phase began after 168 h of culture in all groups.

3. Results

3.1. Growth profiles of static cultures in T-flasks

Throughout the cultivation process, ASC presented a fibroblastoid aspect, with abundant and elongated cytoplasm, and adhesion to the plastic surface. A confluence of 80% of the ASC in the culture flasks was reached at the end of the culture time (192 h - 8 days) in all the experimental groups.

During the growth process of ASC under static culture, unequal cell proliferation was observed. Also, there was a rapid formation of colonies from some cells after adhesion to the surface. Among the ASC colonies, some of them showed a fast proliferation after initial cell division, while others had slower proliferation regardless of the volume of culture medium used.

ASC cultured in T-flasks presented a discrete difference between the cell proliferation patterns as a function of the experimental condition (Fig. 1). An ASC growth standard curve consisting of a lag phase was observed, followed by a logarithmic cell proliferation phase (log/exponential phase), reaching a plateau phase, in which the proliferation rate decreased (Figs. 1, 2A and 2D and 2G). There was an inversely proportional relation, as the number of cell population doublings increased, the growth rate decreased.

Despite discrete variation in the growth profile between the groups, there was no significant statistical difference (p > 0.05) in the comparative analysis of ASC proliferation with different culture medium volumes as a function of cultivation time (Fig. 2A, D and 2G). Proliferation profiles observed showed an exponential phase between 24 (5 mL), 48 (15 mL) and 72 h (10 mL) at 168 h of culture (Fig. 2B, E and 2H). Maximum cell concentration was obtained at the end of the exponential phase except for the group with 10 mL of culture medium that reached the highest cell concentration after 192 h of culture (Figs. 1, 2A and 2D and 2G).

3.2. Determination of kinetic parameters of ASC cultivation

A maximal cell concentration (X_{max}) of 1.09×10^4 cells/cm² was obtained for the volume of 5 ml culture medium; in 10 mL of medium X_{max} was 1.14×10^4 cells/cm², whereas for the 15 mL volume the X_{max} was 1.10×10^4 cells/cm² (p > 0.05). Maximum growth specific rate (μ_{max}) parameters were obtained by the linear regression, with the doubling times (t_d) = 81.5 h (5 mL, Fig. 2C), t_d = 83.5 h (10 mL, Fig. 2F) and t_d = 70.0 h (15 mL, Fig. 2I).

Cell productivity (Equation (3)) was calculated for the triplicate

Biologicals 62 (2019) 93-101



Fig. 2. Cell growth profile of the 5 (A), 10 (D) and 15 mL (G) groups, linear regression ln [cells/cm²] versus the culture time of the 5 (B), 10 (E) and 15 mL (H), and log linear regression for μ_{max} (h⁻¹) in the culture volumes of 5 (C), 10 (F) and 15 mL (I). By the linear regression, the μ_{max} parameters were obtained with the doubling times (td) = 81.5 (5 mL), td = 83.5 h (10 mL) and td = 70.0 h (15 mL) for each group.

samples of each experimental volume. X_{max} values were calculated in the peak of cellular concentration occurred at 168 h of culture in the groups of 5 (46.7 cells/cm²) and 15 mL (43.9 cells/cm²) of culture medium and 192 h for the group of 10 mL (47.4 cells/cm²). The rates found did not represent a significant difference when compared to each other (p = 0.8752).

3.3. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

FT-IR spectra recorded for different culture medium volumes (5, 10 or 15 mL) as a function of the cultivation time are shown in Fig. 3. Complementarily, Table 1 refers to the assignments made to the main bands of the FT-IR spectra obtained by measurements performed in the culture medium.

No influence of the culture medium volumes or ASC cultivation time was observed on the FT-IR spectra (Fig. 3). The main bands found in the spectra are 1081, 1398, 1542 and 1655 cm⁻¹ and may correspond to glucose [34], sodium bicarbonate [35], glutamic acid/glutamate [35] and sodium pyruvate [36], respectively.

3.4. Biochemical concentration of nutrients and metabolites

Concentrations of glucose, lactate, glutamine, and glutamate obtained throughout the ASC culture in different culture medium volumes are presented in Table 2. In general, the nutrients and metabolites varied their concentrations as a function of the cultivation time and in a dependent manner of volume culture medium used, considering that fifty percent of the culture medium volume was renewed every 48 h.

The glucose concentrations (mM) had little variation (p > 0.05) between the groups up to 120 h of ASC culture. Despite the higher experimental culture medium volume, the 15 mL group showed the lowest nutrient concentrations until this period, which curiously increased gradually in the 5 and 10 mL groups. With the acceleration of cell proliferation during the logarithmic phase the glucose concentration fell rapidly (p < 0.05) in the 5 mL group, reaching the mean minimum value of 1.84 mM at 192 h. The 10 and 15 mL groups maintained the glucose concentration close to the initial value even at the end of the culture (Table 2).

While there was a decrease in glucose concentrations in the different culture medium volumes as a function of the cultivation time, the concentrations of lactate metabolite have increased (Table 2). The lactate concentration was higher (p < 0.05) in the 15 mL group until 48 h of culture, however it had little variation throughout the ASC culture, with a mean maximum peak of 3.61 mM. Differently, in the 5 and 10 mL groups, there was a gradual increase (p < 0.05) of the metabolite even with the renewal of 50% of the volume of culture medium every 48 h. Despite the increase, the 10 mL group always had similar concentrations to the other experimental volumes until 168 h, when the 5 mL group reached the highest amount of lactate, with a maximum of 7.62 mM (p < 0.05) at the end of the culture time (Table 2).

Glutamine and its metabolic derivative glutamate also modified their concentrations as a function of the time of ASC in culture. Despite the 15 mL medium volume available for growing cells, glutamine levels



Fig. 3. FT-IR spectra obtained by the culture media scanning of ASC cultured with 5 (A), 10 (B) or 15 mL (C) in different culture time (24, 120 and 192 h). The main bands found in the spectra are in the region of 1081, 1398, 1542, and 1655 cm⁻¹ (Table 1). Independent of culture medium volume used or the cultivation time no significant changes in the spectra were observed.

Table 1

Assignments of the main vibration bands of the FT-IR spectra recorded for the culture medium of ASCs.

Biologicals 62 (2019) 93-101

were lower (p < 0.05) in this group compared to the others up to 96 h of culture (Table 2). In the 5 and 10 mL groups, the glutamine concentrations started to decline from 72 h in the log phase. Highest reduction (p < 0.05) was observed in the 5 mL group, mainly at 144 and 168 h of culture, which showed glutamine values lower than 1 mM for all (p > 0.05) at the end of cultivation (Table 2).

The glutamate concentrations, a precursor of ammonia, gradually increased by glutamine metabolism (Table 2). However, the mean maximum values were less than 1 mM for all ASC groups. The increase in glutamate was higher (p < 0.05) in the 5 mL group, while in the culture with 15 mL of the medium, the metabolic was practically unchanged in their concentrations up to 120 h of culture. In the 10 mL group, the concentrations varied as a function of the culture medium renewal (Table 2).

3.5. Immunophenotyping

The results obtained are summarized in Fig. 4. ASC analysis by flow cytometry after the end of the experimental period and subsequent pool culture presented, for the different markers, presented compatible values with those established by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [47]. Positive markers were present in more than 95% of ASC, while negative markers were below the recommended maximum of 2% of total cells (Fig. 4). From the values obtained, there was no influence of the different culture medium volumes on the incidence of each marker in ASC.

3.6. Chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation of ASC

The ASC potential differentiation in adipocytes, osteocytes, and chondrocytes was investigated to determine if the cells obtained and submitted to the different experimental conditions presented the basic characteristics to be defined as MSC. The pool of cells from the experiments with 5, 10 or 15 mL of culture medium after 192 h of cultivation demonstrated the ability for differentiation in the three meso-dermal lineages (Fig. 5).

Controls for cell differentiation cultured and stained under the same conditions as the experimental flasks, except by receiving α MEM culture medium for growth, proved the effectiveness of the differentiation media. This was observed by the absence of ASC morphological alterations or positive reactions that indicated the presence of differentiations products that would be revealed by the use of the specific dyes (Fig. 5).

Wavelength (cm ⁻¹) – results	m^{-1}) – results Wavelength (cm^{-1}) – literature Assignment		Literature	
700	720	Out-of-plan bending H–C–H	[37]	
1081	1081	ν (C=O) polysaccharides	[38]	
1122-1113	1150-1000	ν (C=O) alcohols, ethers and carbohydrates	[39]	
1393	1400-1390	Antisymmetric deformation C–H	[40]	
1398	1390-1370	Symmetric angular deformation CH ₃	[41]	
1456	1449	β (CH ₂) proteins	[42]	
1542	1542-1531	In-plane deformation N–H	[43]	
1555	1560	β (N–H)	[44]	
1572	1570	Symmetric angular deformation NH ₂	[45]	
1635	1644-1633	ν (N-H)	[43]	
1656	1657	ν (C=C)	[42]	
2874	2950-2850	Symmetric/asymmetric stretch	[43]	
		C–H – Membrane lipids		
2929	2936	ν (C–H) – Methylene group	[42]	
3500-3200	3390	ν (O–H)	[46]	

 ν : stretch; β angular deformation (on the plan).

V.A. Simão, et al.

Table 2

Biochemical (mM) determination of nutrients and metabolites pr	resents in the different v	volumes of culture medium	throughout ASCs culture.
--	----------------------------	---------------------------	--------------------------

Time of culture (h)	Glucose (mM)			Lactate (mM)		
	5 mL	10 mL	15 mL	5 mL	10 mL	15 mL
24	3.87 ± 0.12 a	3.91 ± 0.20 a	3.96 ± 0.12 a	1.92 ± 0.06 a	1.91 ± 0.10 a	2.68 ± 0.20 b
48	4.06 ± 0.20 a	3.99 ± 0.07 a	4.07 ± 0.08 a	2.04 ± 0.15 a	1.97 ± 0.03 a	$2.73 \pm 0.09 \mathrm{b}$
72 ^a	4.54 ± 0.06 a	4.46 ± 0.23 ab	$3.73 \pm 0.18 \mathrm{b}$	2.13 ± 0.06 a	1.99 ± 0.15 a	3.61 ± 1.38 a
96	4.58 ± 0.28 a	4.37 ± 0.22 a	3.93 ± 0.04 a	3.00 ± 0.15 a	2.41 ± 0.21 ab	$2.16 \pm 0.02 \mathrm{b}$
120 ^a	4.31 ± 0.26 a	4.03 ± 0.09 a	3.65 ± 0.14 a	3.70 ± 0.34 a	2.52 ± 0.30 ab	$2.21 \pm 0.23 \mathrm{b}$
144	3.19 ± 0.01 a	$3.83 \pm 0.10 \mathrm{b}$	$3.62 \pm 0.01 \mathrm{b}$	4.55 ± 0.44 a	3.30 ± 0.03 ab	$2.85 \pm 0.20 \mathrm{b}$
168 ^a	2.91 ± 0.11 a	$3.74 \pm 0.24 b$	$3.69 \pm 0.12 \mathrm{b}$	5.22 ± 0.27 a	$3.69 \pm 0.19 b$	$2.83 \pm 0.15 b$
192	$1.84 \pm 0.09 a$	$3.87 \pm 0.34 \mathrm{b}$	$3.26 \pm 0.06 b$	$7.62 \pm 0.38 a$	$3.75 \pm 0.38 \mathrm{b}$	$3.50 \pm 0.16 b$
Time of culture (h)		Glutamine (mM)			Glutamate (mM)	
	5 mL	10 mL	15 mL	5 mL	10 mL	15 mL
24	1.36 ± 0.02 a	1.34 ± 0.01 a	$1.22 \pm 0.03 \mathrm{b}$	0.57 ± 0.01 a	0.57 ± 0.01 a	0.61 ± 0.01 b
48	1.27 ± 0.02 a	$1.27 \pm 0.03 a$	$1.16 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.61 \pm 0.01 a$	0.56 ± 0.03 a	0.60 ± 0.02 a
72 ^a	$1.39 \pm 0.01 a$	$1.32 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$1.18 \pm 0.02 c$	0.67 ± 0.02 a	0.66 ± 0.01 a	$0.60 \pm 0.01 \mathrm{b}$
96	1.26 ± 0.03 a	$1.24 \pm 0.01 a$	$1.12 \pm 0.01 \mathrm{b}$	0.72 ± 0.01 a	$0.67 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.59 \pm 0.01 c$
120 ^a	1.23 ± 0.04 a	$1.19 \pm 0.01 a$	$1.14 \pm 0.01 a$	0.79 ± 0.02 a	$0.62 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.62 \pm 0.01 \mathrm{b}$
144	0.90 ± 0.01 a	$1.07 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$1.02 \pm 0.03 \mathrm{b}$	0.78 ± 0.03 a	0.70 ± 0.01 ab	$0.68 \pm 0.02 \mathrm{b}$
168 ^a	$1.02 \pm 0.01 a$	$1.08 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$1.11 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.83 \pm 0.01 a$	$0.75 \pm 0.02 \mathrm{b}$	0.67 ± 0.02 c
192	$0.89 \pm 0.04 a$	$1.06 \pm 0.06 a$	$0.94 \pm 0.03 a$	$0.92 \pm 0.01 a$	$0.74~\pm~0.02\mathrm{b}$	$0.76~\pm~0.03b$

^a Biochemical measurement of nutrients and metabolites after 24 h of the 50% change in volume of culture medium. ANOVA – Kruskal Wallis. Data in mean \pm standard error. In the same line, for the same nutrient or metabolite, different letters indicate a statistically significant difference between the groups (p > 0.05).



Fig. 4. Representative flow cytometry graphs of the pool of ASC resulting from experiments with different culture medium volumes after 192 h of cultivation and cultivated in the second passage. The analysis shows that reactivity was positive for the surface markers CD73, CD90 and CD105 (> 95% of total cells) and negative for the markers CD34, CD45 and HLA-DR (< 2% of total cells). The entries were defined according to isotype control.

4. Discussion

Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) have been extensively studied due to the great applicability potential in tissue engineering for the regenerative medicine (TERM). However, despite major advances, there are still many gaps in the theoretical knowledge regarding the mechanisms of action of ASCs. There is also great divergence as to methodological issues and lack of standardization concerning cultivation conditions, both in static cultures (T-flasks) and large scale proliferation in bioreactors [16,19,48,49]. In this context, we sought to analyze different parameters during the culture of human adipose-derived mesenchymal stromal cells (ASC) in static cultures (in T-flasks) using different culture medium volumes (5, 10 and 15 mL) for the establishment and standardization of a methodology for the proliferation of this cellular type. For this purpose, different parameters were evaluated during the cultivation process, such as spectroscopy and biochemical medium composition analysis, growth profile, doubling times and max growth rate and the MSC attributes.

In our study, cell proliferation was variable in the first hours of cultivation, so that some colonies showed rapid proliferation after initial cell divisions, while others proliferated slowly independent of culture medium volume used. These results are in agreement with those described by Bruder et al. [50], in which the authors observed that the process of MSC proliferation of the newly adherent population is not
V.A. Simão, et al.



uniform. Some cells quickly originated colonies shortly after adherence to the culture flask, while others did not obtained colonies even after several hours of culture. This bimodality in the rate of colony formation is well documented in fibroblastic cells cultures derived from the original or clonal cell mass [50–52].

The ASC cultured in T-flasks presented a standard growth curve characterized by a stationary phase (lag phase up to 72 h), followed by a logarithmic cell proliferation phase (log phase, 96–168 h), reaching a plateau phase in 192 h of culture (8 days), as shown in Fig. 1. This MSC proliferation profile is already well described in the literature and our results obtained are consistent with previous reports [53–55].

Using the linear regression, as shown in Fig. 2B and C, 2E-F and 2H–I, the maximum specific growth rate parameters (μ_{max}) were obtained with cell doubling times td = 81.5 h, td = 83.5 h and td = 70.0 h for the volumes of 5, 10 mL and 15 mL of culture medium, respectively. These results agree with those reported by Mizuno et al. [4], in which the variation of this parameter was verified during the logarithmic growth phase in the range of 40–120 h.

Cell productivity was calculated for the different culture medium volumes. The rates found did not present the statistical difference between the groups, indicating that there was no difference in the cellular concentration for the same time interval analyzed. The higher the productivity, the more rapidly the desired cell concentration is reached.

Knowledge of the metabolic conditions of the culture medium is one of the essential parameters for achieving high cell productivity, especially in cell therapy procedures, in which a high concentration of cells is required to get the desired therapeutic effects [56]. ASCs consume glucose and glutamine for the generation of energy (ATP) and proteins constitutions that are essential for their maintenance and growth [57,58]. Linked to the glucose consumption, lactate production usually occurs, obtained as a by-product of anaerobic glycolysis, as well as ammonia, after deamination of glutamate converted from glutamine in the generation of ATP by the citric acid cycle [59–62]. These metabolite residues inhibit cell growth and therefore should be kept in low concentrations [63].

As pointed out above, kinetic parameters of in vitro ASC culture related to cell proliferation and viability may be adversely affected by the progressive depletion of nutrients and/or by the inhibitory effect of toxic metabolites. Therefore, it is important the proper optimization and monitoring of culture medium composition throughout the

Biologicals 62 (2019) 93-101

Fig. 5. Differentiation of the pool of ASC submitted to the experiments with different culture medium volumes in T-flasks after 192h of cultivation and cultivated in the second passage. Control for adipogenic (A), osteogenic (D) and chondrogenic (G) differentiations were used. Adipogenic differentiation was confirmed through the presence of lipid vacuoles in the cytoplasm of the cells, indicated by red coloration with Oil Red O (B and C, arrow). Differentiation in osteocytes was verified by staining the orange-red cell matrix with the use of Alizarin Red S (E and F, arrow) and chondrogenic differentiation was confirmed by Alcian Blue staining, where blue indicates the synthesis of proteoglycans by chondrocytes (H and I, arrow), Absence in A. D and G of morphological alterations of ASC or positive reactions that indicate the presence of the differentiation products after staining with the specific dyes proves the differentiation potential of the cultured ASC and only after the stimulus provided by the environment of the differentiation medium. Bars 100 µm (A, D, E, G, and H), 50 µm (F and I) and 25 µm (B and C). Magnification of 100× (A, D, E, G, and H), 200x (F and I) and 400x (B and C). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

cultivation process, using a suitable analytical methodology such as the biochemical determination of nutrients and metabolites, as well as methods to dynamically identify the molecular composition of the culture medium with FT-IR spectroscopy technique.

Based on these analyses, we have demonstrated the relationship between different culture medium volumes and the concentration of nutrients and metabolites in the proliferative potential of ASC. The biochemical analysis demonstrated that the concentrations of nutrients such as glucose and glutamine and by-products like lactate and glutamate varied their concentrations as a function of the culture medium volume and cultivation time. Therefore, nutrients were scarcer for the ASC in the condition of 5 mL of culture medium to the volume of 15 mL. In both cases, there was a reduction in nutrient levels throughout the cultivation.

This reduction was more significant in the group that provided 5 mL of culture medium for the ASC (from 4.58 mM of glucose to 1.84 mM). Directly opposed to the decrease in glucose, the lactate concentration increased over time with a higher concentration (7.62 mM) in the volume with 5 mL of culture medium and more dissolved (3.5 ± 0.25 mM) in the 10 and 15 mL groups (Table 2). This pattern of variation of nutrients and metabolites throughout the culture as a function of cell proliferation has also been observed similarly in previous studies with MSC of bone marrow in spinner flasks and bioreactors [59,64–66].

Considering that the initial cell concentration of ASC was the same for all 25 cm² T-flasks (3.000 cells/cm²), the results demonstrated that, despite the differences in concentrations of nutrients and metabolites available for ASC as a function of volume of medium employed, this was not able to significantly interfere in growth kinetics, observed by similar final cell proliferation between the groups (p > 0.05). This similar cellular productivity probably occurred due to the minimum required the availability of nutrients present in the 5 mL volume, which, although being significantly lower than the other volumes of the medium, was sufficient for adequate cell proliferation of ASC for the methodology of culture adopted in this work. Thereby, our study demonstrates that the availability of nutritional resources above that required for the initial cellular inoculums does not necessarily result in a higher growth rate, cellular concentration or smaller doubling time in ASC cultivation. Indeed, the availability of glucose for MSC proliferation is controversial. Exposure of MSC to high glucose concentration V.A. Simão, et al.

(greater than or equal to 20 mM) has been reported to increase cell proliferation, however, the 70–90% reduction of glucose in the culture medium has also increased MSC proliferation and reduced the senescence by the induction of the aerobic metabolism, a more efficient form of glucose utilization [67]. With regard to glutamine, its high concentration may inhibit the proliferation of ASC [68].

To ensure adequate levels of nutrients and metabolites for ASC proliferation, partial exchanges of the medium during cultivation are necessary for the replenishment of essential nutrients and for the dilution of metabolites which have a detrimental effect on cell proliferation. In this work, the exchanges of 50% of the total volume of culture medium were performed from day 2 of culture and were subsequently maintained every 48 h. The procedure adopted in this study prevented the exhaustion of glucose and glutamine that were above the non-limiting concentration range of 0.13–1 mM and 0.09–0.15 mM, respectively (Table 2) [69].

In addition, there was no mean concentration higher than 7.62 mM (5 mL group) of metabolites, such as lactate, whose inhibitory concentration value is defined as 35.4 mM [70]. However, as presented in Table 2 and Fig. 2, it should be noted that from the log phase of the 5 mL group, the 50% renewal regimen of the medium every 48 h was not effective in restoring nutrient concentrations and metabolites as observed in the volumes with 10 and 15 mL, however, this was not able to cause an injury to the cellular productivity of the group.

These results were corroborated by the FT-IR spectroscopy since new bands were not detected or excluded from the spectra previously acquired in the culture medium, as can be seen from the results presented in Table 1 and Fig. 3. That is, despite the significant variations of nutrients and metabolites concentrations in the culture medium, this did not occur to the point of altering the spectra.

Also, the ASCs after experiments with different culture medium volumes, followed by culture from the pool in the second passage before submission to the immunophenotypic characterization assay, presented adequate values for the different positive or negative markers to an MSC (Fig. 4). Likewise, ASC showed the ability to differentiate, under in vitro induction conditions, into chondrocytes, osteocytes, and adipocytes, as shown in Fig. 5. These results and all the cellular characteristics presented of adhesion to the surface of the culture flask, fibroblastoid aspect and characterization of surface markers by flow cytometry (immunophenotyping) are following the proposed criteria for characterization of an MSC, as proposed by the International Society of Cellular Therapy [16].

Taken together, the results of the biochemical analysis of nutrients and metabolites, FT-IR spectroscopy of the culture medium, immunophenotypic characterization of ASC and their potential for differentiation in mesodermal lines, with the absence of statistical difference regarding the different kinetic parameters of culture analyzed, such as the cell growth and productivity profile for the 5, 10 or 15 mL culture medium volumes, one may conclude that the 5 mL volume can be standardized for ASC cell culture in T-flasks of 25 cm².

Indeed, the use of the 5 mL volume and the 50% renewal regime of the culture medium every 48 h represent an advantage, given the significant reduction in the culture medium volume required for proliferation in cell therapy procedures with human patients, which requires large numbers of cells.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) process #2014/03324–4. V. A. S. was a scholarship of the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel – CAPES and C. P. E. R. by the National Council for Scientific and Technological Biologicals 62 (2019) 93-101

Development –CNPq – PIBIC. The authors also thank Prof. Dr. Carlos J. L. Constantino for the FT-IR experiments, MSc Jaci Leme for the biochemical analyses and Dr. Marcela S. F. Tsuboy for providing language revision.

References

- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med 2004;8(3):301–16.
- [2] Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. An Bras Dermatol 2010;85(5):647–56.
- [3] Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. Int J Chronic Obstr Pulm Dis 2011;6:63–71.
- [4] Mizuno H, Tobita M, Uysal A. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells 2012;30(5):804–10.
- [5] Longhini-dos-Santos N, Barbosa-de-Oliveira VA, Kozma RH, De Faria CA, Stessuk T, Frei F, et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. Stem Cell Rev Rep 2013;9(2):210–8.
- [6] Eridani S. Types of human stem cells and their therapeutic applications. Stem Cell Discov 2014;4(2):13–26.
- [7] Felix RG, Fabro AT, Vicentini-Oliveira JC, Bianchi EH, de Assis-Golim M, Cotrim OS, et al. Rat mesenchymal stem cells from adipose tissue reduce bleomycin-induced lung remodeling in late stage. Stem Cell Discov 2016;6(1):24–38.
- [8] Eaker S, Abraham E, Allickson J, Brieva TA, Baksh D, Heathman TRJ, et al. Bioreactors for cell therapies: current status and future advances. Cytotherapy 2017;19(1):9–18.
- [9] Monsarrat P, Kemoun P, Vergnes JN, Sensebe L, Casteilla L, Planat-Benard V. Spatial and temporal structure of the clinical research based on mesenchymal stromal cells: a network analysis. Cytotherapy 2017;19(1):47–60.
- [10] Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. Stem Cell Rev 2011;7(2):269–91.
- [11] Amorin B, Valim V, Lemos N, Júnior LM, Silva A, Silva M, et al. Mesenchymal stem cells characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications. R HCPA 2012;32(1):71–81.
- [12] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001;7(2):211–28.
- [13] Gimble J, Katz A, Bunnell B. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. Circ Res 2007;100(9):1249–60.
- [14] Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods 2008;45(2):115–20.
- [15] D'Andrea F, De Francesco F, Ferraro GA, Desiderio V, Tirino V, De Rosa A, et al. Large-scale production of human adipose tissue from stem cells: a new tool for regenerative medicine and tissue banking. Tissue Eng C Methods 2008;14(3):233–42.
- [16] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Cytotherapy 2013;15(6):641–8.
- [17] Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. Mol Biol Cell 2010;21(11):1783–7.
- [18] De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA. Human adipose stem cells: from bench to bedside. Tissue Eng B Rev 2015;21(6):572–84.
- [19] Marcelino MY, Fuoco NL, Quaglio AEV, Bittencourt RADC, Garms BC, Conceição THDM, et al. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. J Coloproctol 2015;35(1):20–7.
- [20] Stessuk T, Puzzi MB, Chaim EA, Alves PCM, de Paula EV, Forte A, et al. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. Arch Dermatol Res 2016;308(7):511–20.
- [21] Orgun D, Mizuno H. Multipotency and secretome: the mechanisms behind the regenerative potential of adipose-derived stem cells. Plast Aesthet Res 2017;4:32–40.
- [22] Elseberg C, Leber J, Weidner T, Czermak P. The challenge of human mesenchymal stromal cell expansion: current and prospective answers. New insights into cell culture technology. InTech; 2017. p. 99–134.
- [23] Sanden VD, Dhobb M, Berger F, Wion D. Optimizing stem cell culture. J Cell Biochem 2010;111(4):801–7.
- [24] Rosa F, Sales KC, Carmelo JG, Fernandes-Platzgummer A, da Silva CL, Lopes MB, et al. Monitoring the ex-vivo expansion of human mesenchymal stem/stromal cells in xeno-free microcarrier-based reactor systems by MIR spectroscopy. Biotechnol Prog 2016;32(2):447–55.
- [25] Vojinović V, Cabral J, Fonseca L. Real-time bioprocess monitoring. Part I: in situ sensors. Sens Actuators B 2006;114(2):1083–91.
- [26] Leme J, Fernández-Núñez EG, Almeida-Parizotto L, Chagas WA, dos Santos ES, Caricati ATP, et al. A multivariate calibration procedure for UV/VIS spectrometric monitoring of BHK-21 cell metabolism and growth. Biotechnol Prog 2014;30(1):241–8.
- [27] Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. Analyst 2006;131(8):875–85.
- [28] Lourenço ND, Lopes JA, Almeida CF, Sarraguça MC, Pinheiro HM. Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: a review. Anal Bioanal Chem

V.A. Simão, et al.

- [29] Sellick CA, Hansen R, Jarvis RM, Maqsood AR, Stephens GM, Dickson AJ, et al. Rapid monitoring of recombinant antibody production by mammalian cell cultures using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. Biotechnol Bioeng 2010;106(3):432–42.
- [30] Augusto E, Moraes A, Piccoli R, Barral M, Suazo C, Tonso A, et al. Nomenclature and guideline to express the amount of a membrane protein synthesized in animal cells in view of bioprocess optimization and production monitoring. Biologicals 2010;38(1):105–12.
- [31] Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Princípios de análise instrumental. 5ª ed. Porto Alegre, RS: LCE-108–Química Inorgânica e Analítica; 2002.
- [32] Aroca R. Surface-enhanced vibrational spectroscopy. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2006.
- [33] Fernández-Núñez EG, Leme J, Parizotto LA, Chagas WA, de Rezende AG, da Costa BLV, et al. Influence of aeration-homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism. Cytotechnology 2014;66(4):605–17.
- [34] NIST National Institute of Standards and Technology. Available at: http:// webbook.nist.gov/chemistry/, Accessed date: 18 March 2017.
- [35] Siqueira AB, de Carvalho CT, Rodrigues EC, Ionashiro EY, Bannach G, Ionashiro M. Synthesis, characterization and thermal behaviour on solid pyruvates of light trivalent lanthanides. Ecletica Quim 2007;32(4):49–54.
- [36] Ibrahim M, Alaam M, El-Haes H, Jalbout AF, Leon AD. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. Ecletica Quim 2006;31(3):15–21.
 [37] Anderson JR, Pratt KC. Introduction to characterization and testing of catalysts.
- Sydney, NG: Academic Press; 1985. [38] Dadsetan M, Mirzadeh HAMID, Sharifi N. Effect of CO2 laser radiation on the
- surface properties of polyethylene terephthalate. Radiat Phys Chem 1999;56(5–6):597–604.
- [39] Xue S, Zhao QL, Wei LL, Ren NQ. Behavior and characteristics of dissolved organic matter during column studies of soil aquifer treatment. Water Res 2009;43(2):499–507.
- [40] Tomazoni JC, Guimarães E. Características Espectrais das Frações Humina e Ácido Húmico da Matéria Orgânica Total dos Solos da Bacia do Rio Passo da Pedra. R Bras Geogr Fís. 2015;8(3):721–35.
- [41] Ruschel CFC, Huang CT, Samios D, Ferrão MF, Yamamoto CI, Plocharski RCB. Determinação do número de cetano de blendas de biodiesel/Diesel utilizando espectroscopia no infravermelho médio e regressão multivariada. Orbital - Electron J Chem 2014;6(1):39–46.
- [42] Krafft C, Knetschke T, Siegner A, Funk RH, Salzer R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. Vib Spectrosc 2003;32(1):75–83.
- [43] Sule-Suso J, Forster A, Zholobenko V, Stone N, Haj AE. Effects of CaCl2 and MgCl2 on Fourier transform infrared spectra of lung cancer cells. Appl Spectrosc 2004;58(1):61–7.
- [44] Campana-Filho SP, Britto DD. Estudo das interações entre o complexo polieletrolítico trimetilquitosana/carboximetilcelulose e Cu + 2, ácido húmico e atrazina em solução aquosa. Quim Nova 2009;32(6):1461–6.
- [45] Sujith A, Itoh T, Abe H, Yoshida KI, Kiran MS, Biju V, et al. Imaging the cell wall of living single yeast cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal Bioanal Chem 2009;394(7):1803–9.
- [46] Gharagozlou M, Naghibi S. Sensitization of ZnO nanoparticle by vitamin B 12: investigation of microstructure, FT-IR and optical properties. Mater Res Bull 2016;84:71–8.
- [47] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4):315–7.
- [48] Riis S, Zachar V, Boucher S, Vemuri MC, Pennisi CP, Fink T. Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy. Expert Rev Mol Med 2015;17:1–11.
- [49] Galvanauskas V, Grincas V, Simutis R, Kagawa Y, Kino-oka M. Current state and

perspectives in modeling and control of human pluripotent stem cell expansion

- processes in stirred-tank bioreactors. Biotechnol Prog 2017;33(2):355–64.
 [50] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem 1997;64(2):278–94.
- [51] Martinez AO, Norwood TH, Prothero JW, Martin GM. Evidence for clonal attenuation and differentiation in an in vitro model of hyperplasia. Am J Pathol 1978;74(1):137–54.
- [52] Matsumura T, Pfendt EA, Hayflick L. DNA synthesis in the human diploid cell strain WI-38 during in vitro ageing: an autoradiography study. J Gerontol 1979;34(3):323–7.
- [53] Lei L, Liao W, Sheng P, Fu M, He A, Huang G. Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in multime. Sci China Ser C UK 56: 2007 2002 (2004) 200.
- culture. Sci China Ser C Life Sci 2007;50(3):320–8.
 [54] Zhu M, Gao JH, Lu F, Li H. Cell biological study of adipose-derived stem cells. J South Med Univ 2007;27(4):518–23.
- [55] Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BCTM. Cell Biochem Funct 2008;26(6):664–75.
- [56] Caruso SR. Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de células mesenquimais estromais multipotentes em microcarregadores PhD thesis Brazil; FMRP, Universidade de São Paulo; 2012
- [57] Altamirano C, Paredes C, Cairó JJ, Gòdia F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. Biotechnol Prog 2000;16(1):69–75.
- [58] de Soure AM, Fernandes-Platzgummer A, da Silva CL, Cabral JMS. Scalable microcarrier-based manufacturing of mesenchymal stem/stromal cells. J Biotechnol 2016;236:88–109.
- [59] Schop D, Janssen FW, Borgart E, Bruijn JD, Radersma RVD. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. J Tissue Eng Regenerat Med 2008;2(2–3):126–35. 2008.
- [60] Higuera G, Schop D, Janssen F, van Dijkhuizen-Radersma R, van Boxtel T, Van Biltterswijk CA. Quantifying in vitro growth and metabolism kinetics of human mesenchymal stem cells using a mathematical model. Tissue Eng A 2009;15(9):2653–63.
- [61] Higuera GA, Schop D, Spitters TW, van Dijkhuizen-Radersma R, Bracke M, de Bruijn JD, et al. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. Tissue Eng A 2011;18(5–6):654–64.
- [62] Sart S, Agathos SN, Li Y. Engineering stem cell fate with biochemical and biomechanical properties of microcarriers. Biotechnol Prog 2013;29(6):1354–66.
 [63] Schop D, van Dijkhuizen-Radersma R, Borgart E, Janssen FW, Rozemuller H, Prins
- [63] Schop D, van Dijkhuizen-Radersma R, Borgart E, Janssen FW, Rozemuller H, Prins HJ, et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. J Tissue Eng Regenerat Med 2010;4(2):131–40.
 [64] Mizukami A. Expansão in vitro de células-tronco mesenquimais cultivadas em
- [64] Mizukami A. Expansão in vitro de células-tronco mesenquimais cultivadas em biorreator de fibra oca MSc thesis Brazil: Universidade Federal de São Carlos; 2011
- [65] Rafiq QA, Coopman K, Hewitt CJ. Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: current technologies and future challenges. Curr Opin Chem Eng 2013;2(1):8–16.
- [66] Caruso SR, Orellana MD, Mizukami A, Fernandes TR, Fontes AM, Suazo CA, et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. Biotechnol Prog 2014;30(4):889–95.
- [67] Liu Y, Ma T. Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application. Biotechnol Prog 2015;31(2):468–81.
- [68] Follmar KE, Decroos FC, Prichard HL, Wang HT, Erdmann D, Olbrich KC. Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells. Tissue Eng 2006;12(12):3525–33.
- [69] Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, Da Silva CL, Cabral J. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. J Cell Physiol 2010;223(1):27–35.
- [70] Schop D, Janssen FW, van Rijn LD, Fernandes H, Bloem RM, de Bruijn JD, et al. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. Tissue Eng A 2009;15(8):1877–86.

Biologicals 62 (2019) 93–101

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para coleta de tecido adiposo

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada: "Estabelecimento de uma metodologia para proliferação de células estromais mesenquimais de tecido adiposo humano em biorreator", sob a responsabilidade do pesquisador Me. Vinícius Augusto Simão, RG nº 47.435.777-6. Estas pesquisas estão sob-responsabilidade e coordenação do pesquisador Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, RG nº 709035-0.

Este termo deverá ser elaborado em duas vias. Depois de lido, rubricado e assinado, uma via ficará em poder do sujeito ou de seu representante legal e a outra via em poder do pesquisador responsável.

A pesquisa será realizada com células estromais mesenquimais retiradas do tecido adiposo (gordura). Será utilizada apenas uma parte do material retirado da região abdominal (300 g). O restante, conforme o procedimento que o(a) Senhor(a) conversou com seu médico, será descartado.

A gordura coletada será levada para o nosso laboratório, que está qualificado para a separação das células estromais mesenquimais. As células obtidas serão cultivadas em diferentes metodologias a fim de estabelecer um bioprocesso seguro para a proliferação em larga escala de células estromais mesenquimais aptas à terapia celular.

O seu médico já esclareceu o(a) Senhor(a) dos riscos e benefícios do procedimento de retirada da gordura. Nós não participaremos desta etapa, apenas utilizaremos parte do material coletado pelo médico cirurgião. Se o(a) Senhor(a) concordar em doar parte da gordura

retirada, não haverá risco nenhum para a sua saúde e integridade física, pois todo o estudo será feito em laboratório, após o procedimento cirúrgico.

Sua identidade será mantida em sigilo pelos pesquisadores, sendo utilizados apenas os dados necessários para esta pesquisa, como a faixa etária do(a) doador(a). Informamos ainda que os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica, mas sua identidade será mantida em sigilo.

O(a) Senhor(a) pode a qualquer momento desistir da doação do material, mesmo depois de ter assinado este termo de consentimento. O(a) Senhor(a) deve estar à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo, podendo entrar em contato, a qualquer momento, com os pesquisadores responsáveis ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), cujo nome, telefone e endereço seguem abaixo:

PESQUISADORES:

Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

E-mail: jtrpaes@yahoo.com.br

Telefone (18) 3302-5848

Me. Vinícius Augusto Simão

E-mail: viniciusmorma@gmail.com

Telefone: (18) 98128-8592

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

E-mail: cep@assis.unesp.br

Telefone: (18) 3302-5607

Fax: (18) 3302-5804

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100 – Assis/SP, Cep: 19 806 900

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, nascido(a) em: ____/___, abaixo assinado, concordo em participar, como sujeito, da pesquisa: "Estabelecimento de uma metodologia para proliferação de células estromais mesenquimais de tecido adiposo humano em biorreator".

Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido, ainda, que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Declaro, ainda, que () concordo / () não concordo com a publicação dos resultados desta pesquisa, ciente da garantia quanto ao sigilo das minhas informações pessoais e ao meu anonimato.

Local e data ______, _____ de ______ de ______

Assinatura

Nós, Dr. João Tadeu Ribeiro Paes e Me. Vinícius Augusto Simão, pesquisadores responsáveis pelo estudo, obtivemos de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito/representante legal para a participação na pesquisa.

Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

Me. Vinícius Augusto Simão