

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Genoveva Lourdes Flores Luna

*AValiação DE ADITIVOS PARA MODULAR
A AGLOMERAÇÃO DE
MICROCARREGADORES EM CULTIVOS DE
CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS
MULTIPOTENTES EM FRASCO SPINNER*

São Carlos
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Genoveva Lourdes Flores Luna

***AValiação de Aditivos para Modular
A Aglomeração de
Microcarregadores em Cultivos de
Células Mesenquimais Estromais
Multipotentes em Frasco Spinner***

Projeto de Pesquisa submetido ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

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

Coorientador: Profa Dra. Fernanda de Freitas Aníbal

São Carlos
2014

Resumo

O uso das células mesenquimais estromais multipotentes (CMM) para aplicações na terapia celular e engenharia de tecidos favoreceu uma revolução na medicina atual, permitindo avanços farmacológicos e no panorama clínico de doenças degenerativas e autoimunes, até então incuráveis. A capacidade de diferenciação e o potencial regenerativo das CMM torna-se limitado pelas baixas quantidades disponíveis nos tecidos adultos (0,01 à 0,0005%) juntamente as altas dosagens utilizadas em uma infusão (aproximadamente 10^6 células/kg). Já que os sistemas tradicionais se mostram ineficientes para suprir a demanda, se faz necessário o uso de sistemas de cultivos agitados como frascos spinner, e suportes como microcarregadores, como uma alternativa útil na expansão celular em larga escala. Apesar de ser uma técnica bem consolidada, ainda necessitam-se de alguns ajustes, especialmente no que se refere à tendência natural das CMM à formação de aglomerados, os quais impedem o acesso aos nutrientes e dificultam a recuperação das células no final do cultivo. Sabe-se que aditivos como a dextrana ou suas formas sulfatadas possuem propriedades anticoagulantes e antiaglomerantes, e mostram-se como uma alternativa promissora para modular a formação destes aglomerados. Assim, neste trabalho abordou-se uma perspectiva de solução do problema ao se avaliar a influência do sulfato de dextrana (SD) nos cultivos de CMM em frasco spinner. Desta forma foram realizados cultivos da linhagem hMSC-TERT em frasco spinner contendo o microcarregador Cultispher-S na concentração de 3g/L, 50 mL de meio de cultura α – MEM suplementado com arginina, glicose, glutamina e 15% v/v de soro fetal bovino, mantidos a 37 °C numa incubadora de CO_2 e pH controlado. Os resultados evidenciam que a adição de SD na concentração de 0,05% teve uma influência negativa no cultivo, inibindo o crescimento, quando comparado ao controle. Já a concentração de 0,01% SD permitiu o cultivo das CMM. Embora tenha sido observado a presença de aglomerados, estes não atingiram os diâmetros observados no experimento controle, permitindo um alto crescimento celular chegando-se a fatores de expansão de 13 vezes. Com as células recuperadas após a expansão se comprovou a manutenção das características imunofenotípicas através das análises de citometria de fluxo e a manutenção da potencialidade pela indução da diferenciação em adipócitos e osteócitos. Também se avaliou, seguindo esquema experimental semelhante, um antiaglomerante comercial com resultados pouco satisfatórios.

Palavras-Chave: Células estromais mesenquimais, Biorreator, Aglomerados, Sulfato de dextrana.

Abstract

Use of mesenchymal stem cells (MSC) for applications in cell therapy and tissue engineering allowed a revolution in modern medicine, permitting pharmacological and clinical advances for treatment of degenerative and autoimmune diseases, until then incurable. Differentiation and regenerative potential of the MSC becomes limited by the low levels of cells available in adult tissues (0.01 to 0.0005%) along with the high doses used in an infusion (approximately 10^6 cells/kg). Since traditional systems are shown to be inefficient to meet the demand, the use of culture spinner flask systems and microcarriers as an alternative in large-scale cell expansion has been necessary. Although a well-established technique, it still requires adjustments, especially to the natural susceptibility of the MSC to the formation of agglomerates, which prevent access to nutrients and hampers cell recovery at the end of culture. It is known that additives such as dextran or its sulfated forms have anticoagulant and antiagglomerating properties, being an alternative to modulate the formation of these agglomerates. Thus in this dissertation it will be measured the influence of dextran sulfate (DS) in MSC cultures in spinner flasks. Therefore, were performed cultures of hMSC-TERT lineage in spinner flask containing Cultispher-S microcarrier concentration of 3 g/L, 50 ml α - MEM supplemented culture medium (arginine, glucose, glutamine and 15% v/v fetal calf serum), maintained at 37 °C in a CO2 incubator and controlled pH. Results show that the addition of DS in 0.05% concentration had a negative influence on culture, inhibiting growth when compared to control, however 0.01% DS concentration allowed the cultivation of MSC. Although the presence of agglomerates has been observed, these did not reach the diameters observed in the control experiment, allowing a high cell growth by reaching a 13-fold expansion factor. With recovered cells after expansion, it was proved the maintenance of the immunophenotypic characteristics by analysis of flow cytometry and the potential for inducing differentiation into adipocytes and osteocytes. It was also evaluated, following similar experimental scheme, a commercial anticlumping, however, the results obtained were not satisfactory.

Key-words: Mesenchymal stem cell, Bioreactor, Agglomerates, Dextran sulfate.

Lista de ilustrações

Figura 1.1 – Pirâmide hierárquica das células tronco.	18
Figura 1.2 – Processo Mesengênico.	20
Figura 1.3 – Modelo esquemático das propriedades biológicas das CMM associadas com os seus efeitos terapêuticos.	22
Figura 1.4 – Curva de crescimento padrão para células animais em cultura. (LAGES; LÉO; SUAZO; MORAES, 2007)	24
Figura 1.5 – Imagens de microscopia eletrônica de diversos microcarregadores. (A) Estrutura do Cytodex, microcarregador microporoso.	26
Figura 1.6 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do Microcarregador Cultispher-So.	27
Figura 1.7 – Biorreator Wave 2-10 (GE Healthcare)	30
Figura 1.8 – Esquema do movimento de ondas gerado no biorreator Wave que permite a mistura de meio celular e células	30
Figura 1.9 – Esquema de biorreator de tipo Tanque agitado	31
Figura 1.10–Esquema de um biorreator de fibra oca	32
Figura 1.11–Sistema de cultivo em biorreator de fibra oca	32
Figura 1.12–Síntese geral das dextranas a partir da sacarose	37
Figura 2.1 – Esquema do Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares	41
Figura 2.2 – Esquema completo de cultivo das células hMSC-TERT para realização de experimentos em frasco spinner	46
Figura 2.3 – Representação da reação enzimática em que se fundamenta o método do MTT	50
Figura 3.1 – Resultados do experimento 1 realizados em placas de poliestireno de 24 poços, sem microcarregadores	56
Figura 3.2 – Resultados obtidos no Experimento 2 (primeiro controle) com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner	59
Figura 3.3 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorer do experimento 2	60
Figura 3.4 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorer do experimento 3	61
Figura 3.5 – Resultados obtidos no Experimento 3 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner	62
Figura 3.6 – Resultados obtidos no Experimento 4 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner	64
Figura 3.7 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no de- correr do experimento 4	65

Figura 3.8 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 5	66
Figura 3.9 – Resultados obtidos no Experimento 5 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner	67
Figura 3.10–Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 6	69
Figura 3.11–Resultados obtidos no Experimento 6 (segundo controle) com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner	70
Figura 3.12–Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 7	72
Figura 3.13–Resultados obtidos no Experimento 7 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner	73
Figura 3.14–Resultados do experimento 8 realizados em placas de poliestireno de 24 poços, sem microcarregadores	75
Figura 3.15–Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 9	76
Figura 3.16–Resultados obtidos no Experimento 9 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner	77
Figura 3.17–Resultados das células recuperadas durante os cultivos em frasco spinner	78
Figura 3.18–Principais marcadores imunofenotípicos das CMM pré e pós cultivo no experimento 7	79
Figura 3.19–Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT pre e pós o cultivo em spinner no experimento 7	81
Figura 3.20–Diferenciação das células em adipócitos e osteócitos	82

Lista de tabelas

Tabela 1.1 – Fontes de obtenção das CMM	21
Tabela 1.2 – Cultivos de CMMs com microcarregadores em frasco spinner	28
Tabela 1.3 – Classificação dos biorreatores	29
Tabela 2.1 – Componentes do Meio α -MEM com vermelho de fenol utilizado no cultivo da linhagem celular hMSC-TERT	42
Tabela 2.2 – Principais características do microcarregador Cultispher [®] -S	43
Tabela 2.3 – Principais características do Sulfato de Dextrana	44
Tabela 2.4 – Detalhes dos processos realizados na diferenciação celular	52
Tabela 3.1 – Condições iniciais para cultivos em frasco spinner	53
Tabela 3.2 – Resumo dos experimentos realizados	54
Tabela 3.3 – Resumo dos resultados obtidos nos cultivos em frasco spinner de CMM com microcarregador Cultispher-S [®]	84

Lista de abreviaturas e siglas

$\alpha - MEM$	Associação Brasileira de Normas Técnicas.
μ	Velocidade específica de crescimento.
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica de crescimento máxima.
μm	Micrômetros.
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> - ovário de hamster chinês.
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência.
Cl _s	Células livres na suspensão.
CMM	Células estromais mesenquimais multipotentes.
Dm _A	Diâmetro médio dos aglomerados.
DEQ	Departamento de Engenharia Química.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucleico.
FUNDHERP	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.
g	Gramas.
GFP	Green fluorescent protein – proteína fluorescente verde.
h	Hora.
LATECC	Laboratorio de Tecnologia de Cultivo Celulares.
PBS	Phosphate Buffered Saline – Salina tampão de fosfato.
rpm	Rotações por minuto.
mm	Milímetros.
MSC	Mesenchymal stromal cells – Células estromais mesenquimais.
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio.
N_{ca}	Número de células aderidas ao microcarregador.

pH	Potencial de hidrogênio.
SD	Sulfato de dextrana.
t_1	Tempo 1.
t_2	Tempo 2.
TERM	Telomerase reverse transcriptase – transcriptase reversa da telomerase.
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos.

Sumário

Introdução	12
Objetivos	16
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 Célula Tronco	17
1.1.1 Célula estromal mesenquimal multipotente	20
1.1.2 Aplicações terapêuticas das CMM	21
1.2 Fases do crescimento celular	23
1.3 Metabolismo Celular	24
1.4 Microcarregadores	25
1.5 Biorreatores	28
1.5.1 Classificações dos biorreatores	29
1.5.1.1 Biorreatores Homogêneos	29
1.5.1.2 Biorreatores Heterogêneos	31
1.5.2 Modos de operação dos biorreatores	32
1.6 Usos de biorreator de frasco spinner na expansão de células mesenquimais estromais multipotentes	33
1.7 Uso de Aditivos no controle de aglomerados celulares.	34
1.8 Sulfato de dextrana	37
1.9 Comentários sobre a revisão bibliográfica	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Locais de trabalho	41
2.2 Materiais	41
2.2.1 Linhagem celular	41
2.2.2 Meios de cultivo	42
2.2.2.1 Meio α -MEM	42
2.2.2.2 Meio de Congelamento	42
2.2.3 Corante	42
2.2.4 Enzimas de dissociação celular	43
2.2.5 Microcarregadores	43
2.2.6 Solução antiaderente	43
2.2.7 Reagente MTT	43
2.2.8 Frasco de Cultura.	44
2.2.9 Frasco Spinner	44
2.2.10 Sulfato de dextrana	44
2.2.11 Anti-aglomerante	44
2.3 Métodos para o cultivo celular	44

2.3.1	Preservação celular	44
2.3.2	Ativação Celular	45
2.3.3	Cultivo estático em frascos T	45
2.3.4	Cultivos em frasco spinner	46
2.4	Métodos analíticos	47
2.4.1	Análise de densidade e viabilidade celular	47
2.4.2	Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max})	48
2.4.3	Cálculo do fator de diluição (FD)	49
2.4.4	Determinação da densidade celular total pelo método baseado no MTT	49
2.4.5	Análises de nutrientes e metabólitos	50
2.4.6	Recuperação das células aderidas aos microcarregadores	51
2.4.7	Análise de diâmetros médios dos aglomerados de microcarregadores	51
2.4.8	Análises de Imagens	51
2.4.9	Análises de Citometria de fluxo	51
2.4.10	Diferenciação celular	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1	Seleção de condições de cultivo	53
3.2	Planejamento dos experimentos	54
3.3	Experimento 1	55
3.4	Experimento 2	56
3.5	Experimento 3	60
3.6	Experimento 4	62
3.7	Experimento 5	65
3.8	Experimento 6	68
3.9	Experimento 7	71
3.10	Experimento 8	74
3.11	Experimento 9	75
3.12	Recuperação celular pós-cultivo	78
3.13	Avaliação imunofenotípica e funcional das CMM pós cultivo	79
3.13.1	Imunofenotipagem	79
3.13.2	Diferenciação	82
3.14	Análise geral dos experimentos realizados	83
4	CONCLUSÕES	85
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Introdução

As células-tronco (CT) são células com capacidade de multiplicação prolongada ou ilimitada, que podem- se diferenciar e constituir diferentes tecidos no organismo. Essas características despertaram nos últimos 20 anos o interesse da medicina por essas células para aplicações em terapia celular e terapia gênica (MIMEAULT et al., 2007). Nos dias atuais, uma surpreendente soma de recursos materiais e humanos é destinada ao estudo das CT e do seu potencial na regeneração de tecidos ou de órgãos irremediavelmente lesados por doenças ou congenitamente malformados, o que se traduz em ensaios clínicos que involucram células tronco para pelo menos 12 tipos de condições patológicas, muitos deles concluídos demonstrando segurança e eficácia (WANG et al.,2012).

Existem duas categorias de células-tronco: as células-tronco embrionárias pluripotentes e as linhagens de células unipotentes ou multipotentes, denominadas células-tronco adultas, que residem em tecidos diferenciados. (ODORICO et al., 2001).

Populações de CT podem ser encontradas na maioria dos tecidos do adulto como medula óssea, sangue periférico, placenta, cordão umbilical além de diversos tecidos fetais. Pode-se destacar um tipo de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (hMSC), também conhecidas como células tronco esqueléticas, células estromais da medula óssea ou, como recentemente sugerido pela International Society for Cytotherapy (ABDALLAH, 2008; HORWITZ, 2005) células mesenquimais estromais multipotentes (CMM). Embora estas células tenham sido isoladas inicialmente da medula óssea, estão presente em diversos tecidos adultos como o tecido adiposo (ZUK et al., 2001) músculo esquelético (BARRY; MURPHY, 2004), tecido epitelial (SLACK, 2000), veia umbilical (COVAS et al., 2003)

Apesar do potencial de aplicação que as CMM tem demonstrado sua utilização esbarra na necessidade de grandes quantidades de células que se encontram em baixas quantidades nos tecidos (0,01 à 0,0005%) e as altas doses utilizadas numa infusão (aproximadamente 10^6 células/Kg de paciente) (CAPLAN, 2007; SUBANNA, 2007). Devido a isso, o desenvolvimento de tecnologias eficientes de expansão *in vitro* que possibilitem a obtenção de grandes quantidades de células com adequada qualidade terapêutica e custo reduzido é de crucial importância. Segundo (MARTIN et al.,2004) e (GODARA et al.,2008) a utilização de biorreatores para a expansão de CT parece ser a solução para atingir esses objetivos.

As CMM se caracterizam por serem altamente dependentes de ancoramento ou adesão a uma matriz para poder exercer suas atividades vitais normais. Nos cultivos *in vitro* crescem na superfície de frascos de poliestireno especialmente tratado para favorecer

a adesão de células em monocamadas. Porém, este tipo de cultivo estático além de não permitir um adequado controle das condições ambientais do cultivo, demanda um extenso trabalho de manipulação que aumenta consideravelmente os riscos de contaminação e o custo do cultivo (WEBER et al., 2007).

Assim, para aumentar a produtividade celular surge a necessidade da utilização de biorreatores, que são equipamentos que reproduzem condições físico-químicas (temperatura, pH, oxigênio dissolvido) favoráveis para as células com uma menor intensidade das forças hidrodinâmicas provocadas pela agitação e oxigenação, melhor distribuição dos nutrientes e eliminação dos metabólitos tóxicos.(CHICO et al., 2008). Um biorreator muito usado para estes cultivos celulares em escala de laboratório é o frasco spinner, frasco de vidro ou plástico com agitador magnético e braços laterais para a adição e remoção de meio de cultivo e células.

Para poder cultivar células dependentes de ancoramento num biorreator com meio de cultura líquido se faz necessária uma matriz sólida com uma área superficial grande e apropriada para adesão celular. VAN WEZEL (1967) resolveu esse problema com a adição de partículas que hoje são conhecidas como microcarregadores, ou seja, partículas geralmente esféricas que servem de suporte para células dependentes de ancoramento (SCHOP et al., 2008). Na atualidade esta tecnologia está bastante consolidada e é amplamente utilizada no cultivo de células animais (BOO et al., 2011;EIBES et al.,2010; FERNANDEZ et al., 2007; FERRARI et al., 2013; FRAUENSCHUH et al., 2007; HEWITT et al., 2011; JUNG et al., 2012; MALDA et al., 2004; SART et al., 2009; SCHOP et al., 2008; SUN et al., 2010; YANG;ROSSI;PUTNINS,2007).

Os sistemas de cultivos agitados como frasco spinner, e o uso de microcarregadores, tem sido uma alternativa útil na expansão celular em larga escala. Porém alguns problemas técnicos ainda precisam ser resolvidos, especialmente no que se refere à tendência natural das CMM à formação de aglomerados, os quais impedem o acesso de nutrientes ao seu interior, levando à morte das células. (EIBES et al., 2010; FRAUENSCHUH et al., 2007; YANG et al., 2007).

Os aglomerados se formam principalmente de acúmulos da matriz extracelular. A matriz é uma rede tridimensional composta por polissacarídeos do tipo glicosaminoglicanos (GAG), ácido hialurônico, sulfato de condroitina, heparina, sulfato de heparina e queratan sulfato, que são moléculas pouco flexíveis que ocupam um grande volume e fazem com que a matriz se comporte como um gel. Outro componente fundamental da matriz são as proteínas fibrosas, como por exemplo colágeno, elastina, fibronectina e laminina, com funções estruturais e adesivas. Entre as principais funções da matriz extracelular estão preencher os espaços não ocupados pelas células, fornecer resistência aos tecidos, agir como meio para transporte de sinais intercelulares e ancoragem para as células. (Alberts et al., 2007).

Os processos de adesão e migração celular são mediados por diferentes proteínas, assim, para os processos de adesão célula-célula, as caderinas tem maior influência, já os processos de adesão às superfícies são mediados principalmente pelas integrinas (KOLF et al., 2007).

Para entender melhor o fenômeno de agregação, Debruyne e colaboradores (2009) utilizaram o ensaio de agregação lenta (Boterberg et al.,2001) para descrever o efeito de opióides nos processos de adesão célula- célula e célula-substrato para células HEK. Assim foi observada que a presença destas substâncias diminuíam a adesão célula-substrato, o que pode resultar em mais movimento celular promovendo mais contatos entre as células o que resulta na formação de agregados maiores.

Estudos recentes apontam (SANTOS et al., 2010; MOHYELDIN; GARZÒN-MUVDI; QUIÑONES-HINOJOSA, 2010) que o aglomerado não tem só efeitos negativos nas culturas de CMM, já que certas faixas de tamanhos formam nichos naturais de hipóxia,(condições que geram número maior de células em comparação com as condições de normóxia), podem melhorar fase de crescimento exponencial, e aumentar a eficiência do metabolismo celular. Outros estudos apresentam as propriedades anti-inflamatórias de agregados de CMM com um elevado potencial terapêutico (BARTOSH et al., 2010).

Algumas das estratégias para a modulação dos aglomerados, podem ser encontradas nos estudos de Ferrari e colaboradores em CMM de porcos onde se sugere redução da formação de aglomerados célula-célula acrescentando ao sistema de cultivo microcarregadores para facilitar a adesão das novas células produzidas pelo crescimento (FERRARI et al., 2012). Já outros autores recorrem à utilização de microesferas não rígidas e que não interagem com as células para tentar evitar as colisões entre microcarregadores e reduzir ou retrazar a formação destes aglomerados (MENDONÇA,2013).

Quanto ao uso de aditivos para solucionar os problemas de agregação, é relatado na literatura o uso de poliânions sulfatados. Assim em estudos realizados com duas linhagens celulares BTI-TN5B1-4 e IPLB -SF21, observou-se uma redução de agregados celulares quando em contato com substâncias sulfatadas como a heparina, sulfato de condritina e o sulfato de dextrana (SD), de todas as substâncias testadas, o sulfato de dextrana (SD) despertou um grande interesse ao aumentar a viabilidade celular e a produtividade do cultivo.(DEE et al., 1997).

Outro estudo sugere possíveis efeitos antiapoptóticos do SD. Estes efeitos aumentariam a viabilidade celular e teriam um efeito benéfico ante os fatores de stress oxidativo, esgotamento de nutrientes e acúmulos de metabólitos.(YING et al., 2011).

Contudo, ainda existem poucos relatos na literatura especializada de técnicas eficientes que modulem a formação de agregados de microcarregadores. Esta situação constitui um obstáculo para a expansão em larga escala de CMM preservando seu potencial

de diferenciação e visando atender as demandas em número de células que surgem do desenvolvimento de terapias celulares inovadoras (ASHTON et al., 2011) e dos avanços conseguidos na engenharia de tecidos (KIROUAC;ZANDSTRA, 2008). Neste trabalho propõe-se o estudo da adição de antiaglomerantes como sulfato de dextrana (SD) e produtos comerciais similares ao meio de cultura para o cultivo de CMM em frasco spinner.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o efeito de agentes antiaglomerantes no rendimento da expansão e recuperação de CMM cultivada em microcarregador em suspensão visando sua produção em larga escala com qualidade terapêutica.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a influência de sulfato de dextrana (SD) como antiaglomerante no crescimento celular, metabolismo e características fenotípicas e funcionais de CMM cultivadas em microcarregador suspenso em frasco spinner.
- b) Avaliar a influência de antiaglomerante comercial no crescimento celular, metabolismo e características fenotípicas e funcionais de CMM cultivadas em microcarregador suspenso em frasco spinner.
- c) Comparar os dois antiaglomerantes para identificar o mais conveniente para cultivos em suspensão em escalas maiores.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Célula Tronco

Assim, como o descobrimento dos antibióticos criou uma revolução no mundo da medicina, no presente o uso das células tronco favoreceu avanços farmacológicos e o panorama clínico para pacientes que sofrem de doenças degenerativas e autoimune, até hoje incuráveis como o Parkinson ou o Alzheimer ou Diabetes tipo 1. As células tronco são especiais em virtude da sua capacidade de autorrenovação, divisão ilimitada e diferenciação em quase todos os tipos celulares. (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005) (ODORICO et al., 2001).

As células tronco são classificadas de acordo com sua capacidade proliferativa e de diferenciação em: i) células tronco totipotente, ii) pluripotentes e iii) multipotentes. Assim, as células totipotentes, em teoria, podem dar origem a um organismo inteiro; já as células tronco pluripotentes podem dar origem a qualquer tipo celular no organismo adulto. Por sua vez, células tronco multipotentes possuem uma capacidade mais limitada de se diferenciar em diferentes tipos celulares, estando presente em praticamente todos os tecidos adultos e se diferenciando principalmente em células do tecido no qual estão inseridas. (RODRIGUES; FONSECA, 2004), (SMITH, 2006). (Figura 1.1).

Células tronco multipotentes são melhor descritas na literatura. Incluem as células tronco hematopoiéticas, células tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais (todas presentes na medula óssea). Além de, células tronco cardíacas; células tronco neurais, presentes no sistema nervoso central; células satélites, presentes no músculo esquelético. (ZHANG et al., 2006). A Figura 1.1 apresenta uma divisão hierárquica dos tipos de células tronco de acordo com a potencialidade.

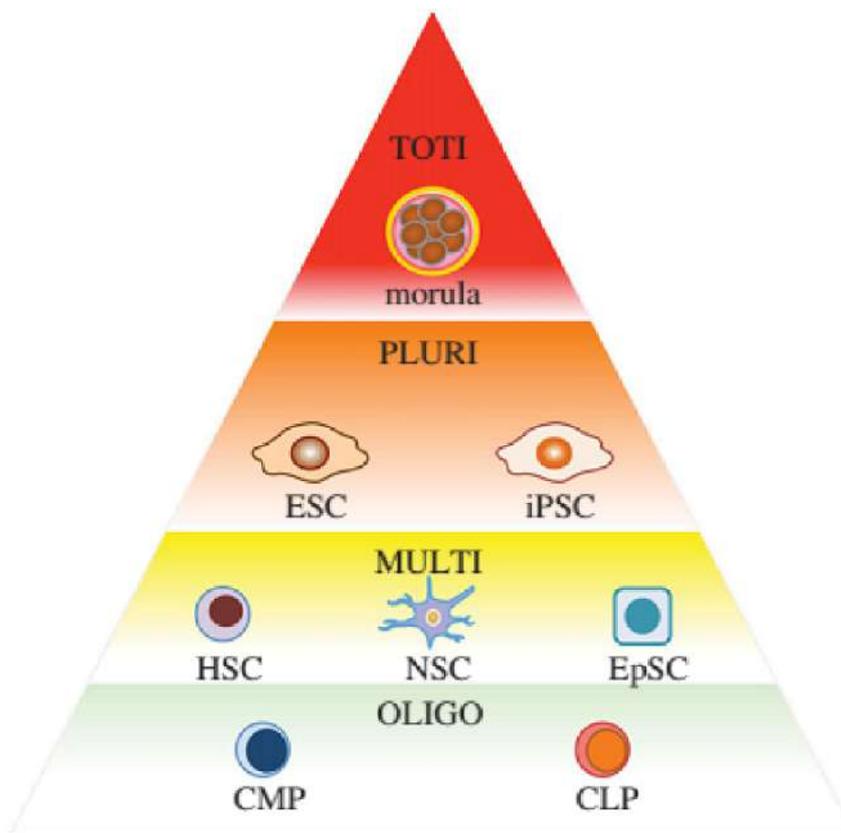


Figura 1.1 – Pirâmide hierárquica das células tronco de acordo a seu potencial de diferenciação(Huan-Ting;Makoto;Nakauchi, 2012).

Quanto à origem, as células-tronco podem ser divididas em: células-tronco embrionárias ou adultas. Assim, as células embrionárias, como o próprio nome denota, são derivadas da massa celular interna de um blastocisto (embrião prematuro) entre o quinto e sexto dia. (THOMSON et al.,1998). Foram isoladas com êxito por Thompson e colaboradores (1998) e após anos de pesquisas, as células de humanos e camundongos encontram-se bem caracterizadas; porém, seu uso em terapia celular está comprometido por questões éticas e de segurança. (PEREIRA, 2008).

Referente as questões de segurança, os primeiros estudos realizados em células embrionárias de ratos, por Evans e Kaufman em 1981, demonstraram que, ao induzir a diferenciação nestas células e transferir aos indivíduos, resultaram na formação de teratomas. Em 2009, Mimeault e colaboradores, ao trabalhar com células tronco embrionárias humanas, relataram a possibilidade de reações de rejeição imunológica, relacionado ao fato de que as células embrionárias pertencem a outro indivíduo, além da possibilidade de formação de tumores nos indivíduos receptores.

As pesquisas com células-tronco provenientes do embrião humano apresentam problemas éticos complexos, assim, se discute se é incorreta a destruição da vida embrionária para fins de pesquisa e terapia celular, pois é necessário interromper o desenvolvimento

do blastocisto após 5-6 dias da fecundação. Esta desestruturação do embrião significa tirar a potencialidade dele se tornar um ser humano (RINGE et al., 2002). O marco "zero" do início da vida sem dúvida é a fertilização. O entendimento de quando o embrião é considerado pessoa gera dilemas e varia com a cultura, a religião e a moral de cada um. No Brasil, a lei de Biossegurança Lei n.11.105, promulgada em 24 de março de 2005, dispõe no artigo 5º, que é "permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* não utilizados no respectivo procedimento", assim permite-se a utilização dos embriões excedentes. No entanto, a lei não discorre sobre o destino dos embriões congelados após a lei ou aqueles que não serão doados pelos seus pais, indicando que, posteriormente, essa lei necessitará de uma revisão (GOMES, 2007).

Assim, dentro do grupo de células embrionárias pode-se encontrar também dois subtipos de linhagens celulares multipotentes, como as chamadas células do carcinoma embrionário e células germinativas embrionárias. As primeiras são encontradas ocasionalmente em malformações de ratos ou humanos. Estas linhagens possuem capacidades de formar as três camadas germinativas, embora, o potencial das células germinativas embrionárias seja mais limitado (ODORICO et al., 2001).

Nos últimos anos está se intensificando o interesse em estudos referentes à presença de células tronco em tecidos como a placenta, líquido amniótico e cordão umbilical. (FERNANDEZ et al., 2012; FUKUCHI et al 2007). Desta forma, surgiu um novo grupo de células tronco, as chamadas células tronco fetais. Tais células se apresentam como uma alternativa para banco de células, uma vez que são descartadas após o parto, oferecendo uma vantagem sobre as células tronco embrionárias ou adultas. (BRUNSTEIN; WAGNER, 2005). Na atualidade existem estudos com células fetais não só em humanos mas também para tratamentos em animais. Estudos realizados com células do líquido amniótico de cães mostrou que podem-se diferenciar em linhagens neurogênicas. (FERNANDEZ et al 2012). Com relação às células tronco fetais humanas foi comprovado a expressão de marcadores de pluripotência e a capacidade de diferenciação em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas (PRUSA et al., 2004).

As células tronco adultas são aquelas que garantirão a manutenção e a integridade dos tecidos nos organismos já formados. (CAPLAN, 2009). A maior diferença entre as células tronco embrionárias e as adultas é a restrição que estas últimas apresentam referente a diferenciação, já que não podem formar todos os tipos celulares.

As células tronco adultas se dividem em dois grupos, as germinativas e somáticas. Define-se como células tronco adultas germinativas aquelas que podem gerar 1 tipo celular dependendo do sexo do indivíduo (fêmea ou macho), por tanto elas são unipotentes. Já as células somáticas são multipotentes e apesar de ter capacidade de diferenciação limitada quando comparada com as embrionárias, geram múltiplas linhagens celulares e apresentam

vantagens como não ter implicações éticas envolvidas no seu uso, razão pela qual apresenta um potencial interessante na medicina regenerativa. (GODARA et al.,2008).

1.1.1 Célula estromal mesenquimal multipotente

Dentro do grupo das células tronco adultas somáticas encontramos as células tronco mesenquimais (MSCs), nomeadas assim porque foram inicialmente isoladas da medula óssea. Desta forma, a palavra "mesenquimal" faz referência às linhagens hematopoiéticas, mesmo que este tipo de célula não possa diferenciar-se em nenhuma delas. (HUAN-TING; OTSU; NAKAUCHI, 2012). Recentemente e para evitar confusões a International Society for Cellular Therapy sugeriu um novo nome e então passaram a se denominar células estromais mesenquimais multipotentes, estas células são capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, fibroblastos e outros tecidos de origem mesenquimal conforme apresentado na Figura 1.2.

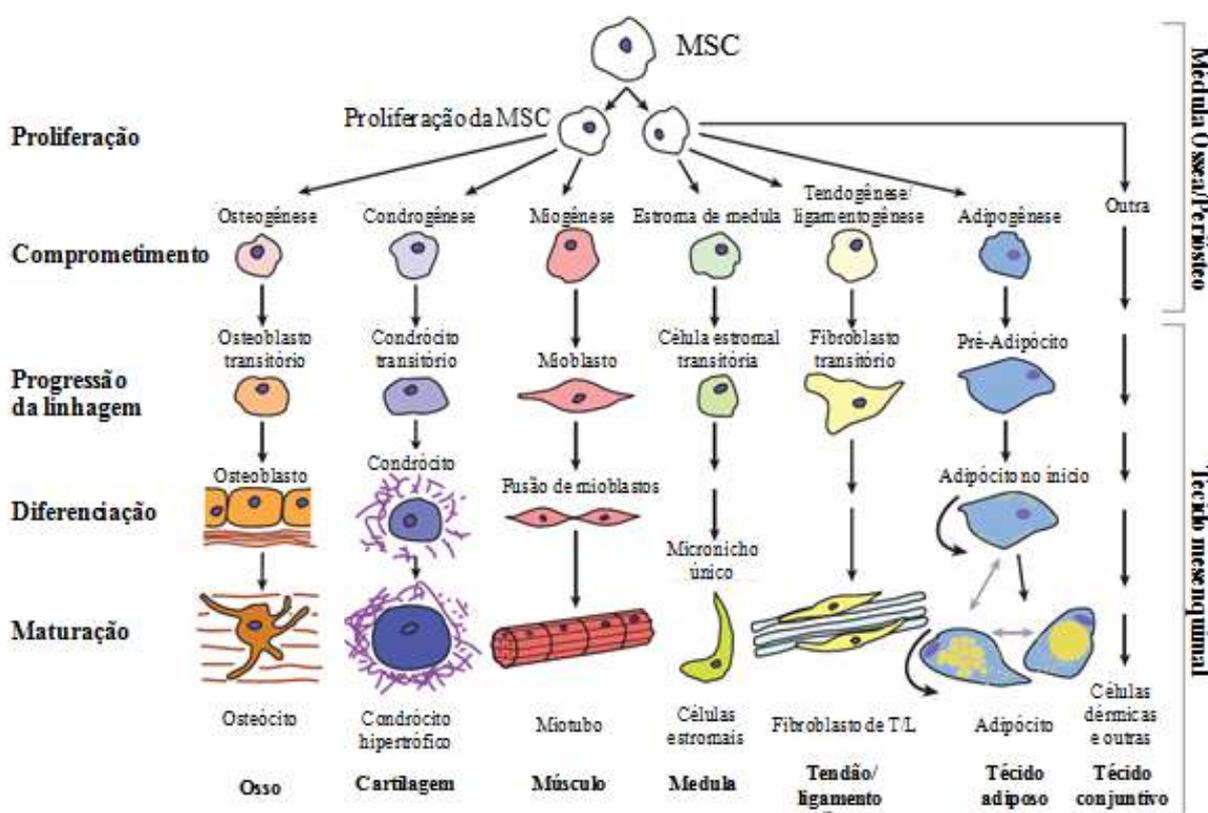


Figura 1.2 – Processo Mesengênico (SINGER; CAPLAN, 2011).

Embora, tenham sido isoladas tradicionalmente da medula óssea, também foram encontradas em numerosos tecidos adultos, como o tecido adiposo, musculo esquelético, fígado, rim pulmão, (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006), tendão e ligamento (GODARA; NORDON; MACFARLAND, 2008b).

A Tabela 1.1 apresenta os principais aspectos comparativos entre fontes de obtenção das CMM.

Tabela 1.1 – Fontes de obtenção das CMM (Adaptado de Wagner et al 2005).

Parâmetro	Médula Óssea	Sangue cordão umbilical	Tecido adiposo
Sucesso no isolamento	100%	30-34%	100%
Diferenciação Osteogênica	71,4%	100%	78,8%
Diferenciação Adipogênica	100%	0%	94%
Diferenciação Condrogênica	100%	100%	100%
Formação de Monocamada	4-5 dias	2-4 semanas	4-5 dias

Neste trabalho é de principal interesse o estudo das células mesenquimais multipotentes. Estas células exibem uma morfologia típica de fibroblasto, são aderentes à superfícies plásticas, podem expandir-se por quase 40 gerações, mantendo sua capacidade multipotente (DEANS; MOSELEY, 2000). Tipicamente expressam um grande número de moléculas na sua superfície conhecidas como marcadores, e estas moléculas podem ser proteínas de membrana e receptores para fatores de crescimento (BOBIS et al., 2006).

Assim, para que uma célula seja reconhecida como tal deve expressar os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90; e não expressar os marcadores de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e HLA-DR pois eles são clássicos de células hematopoiéticas. (KEATING, 2006; HORWITZ, 2005). Embora, já tenham sido identificados muito outros marcadores de superfície para identificação de MSC, a International Society for Cellular Therapy concorda que, apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, e a não expressão de marcadores hematopoéticos, é suficiente para a imunofenotipagem dessas células e decidir para que sejam reconhecidas como células tronco (HORWITZ et al., 2005).

1.1.2 Aplicações terapêuticas das CMM

O uso terapêutico das CMM se deve em parte ao potencial imunomodulatório, propriedade mediante a qual as CMM são capazes de modular as funções de uma população de células do sistema imune através da ação parácrina. Estudos demonstram que, as CMM ao entrarem em contato com tecidos (allogênicos ou autólogos) desencadeiam a liberação de fatores solúveis que agem no sistema imune, tais como interleucinas (IL-4, IL-6) e o fator de crescimento transformador beta ($TGF - \beta$) (NAUTA; FIBBE, 2007).

As propriedades imunomoduladoras das CMM também podem fornecer novas vias para o tratamento das alergias. Estudos realizados demonstram que, ratos que apresentavam alergia nas vias respiratórias, após o tratamento com CMM demonstravam atenuação da resposta do sistema imunológico, reduzindo significativamente o quadro alérgico (SUN;

DENG, 2012). Outros estudos sobre o fato das CMM intervirem nos processos de alergia, pode ser explicado pela influência destas sobre a função dos mastocitos, principais células que secretam importantes mediadores das respostas alérgicas, como histamina, o que sugere possíveis aplicações das CMM como uma fonte de células alternativa para o tratamento de doenças alérgicas graves (BROWN;MEZEY, 2013).

Graças às propriedades anteriormente citadas tem-se demonstrado em modelos experimentais que, as CMM são capazes de regenerar tecidos lesionados como osso, cartilagem e inclusive músculo cardíaco (KASSEM; KRISTIANSEN; ADBALLAH, 2004).

Entre as principais aplicações clínicas encontradas para as CMM estão: a reparação do tecido ósseo e quando combinada com matrizes de hidroxiapatita e fosfato. Os resultados obtidos por esses tratamentos são potencializados com a adição de células *in situ* (SCHMITT., 2012).

Terapias celulares que utilizam as CMM no tratamento de doenças relacionadas ao coração, como insuficiência cardíaca ou tratamentos após infartos, mostraram-se promissores, pois foi comprovado melhora do quadro clínico após a administração sistêmica ou local. Tal como nos estudos realizados por Nagaya e colaboradores no qual se verificou o aumento da densidade capilar em tecidos de miocárdio infartado em ratos.(NAGAYA et al., 2005).

A Figura 1.3 apresenta as propriedades das CMM e seus efeitos terapêuticos.

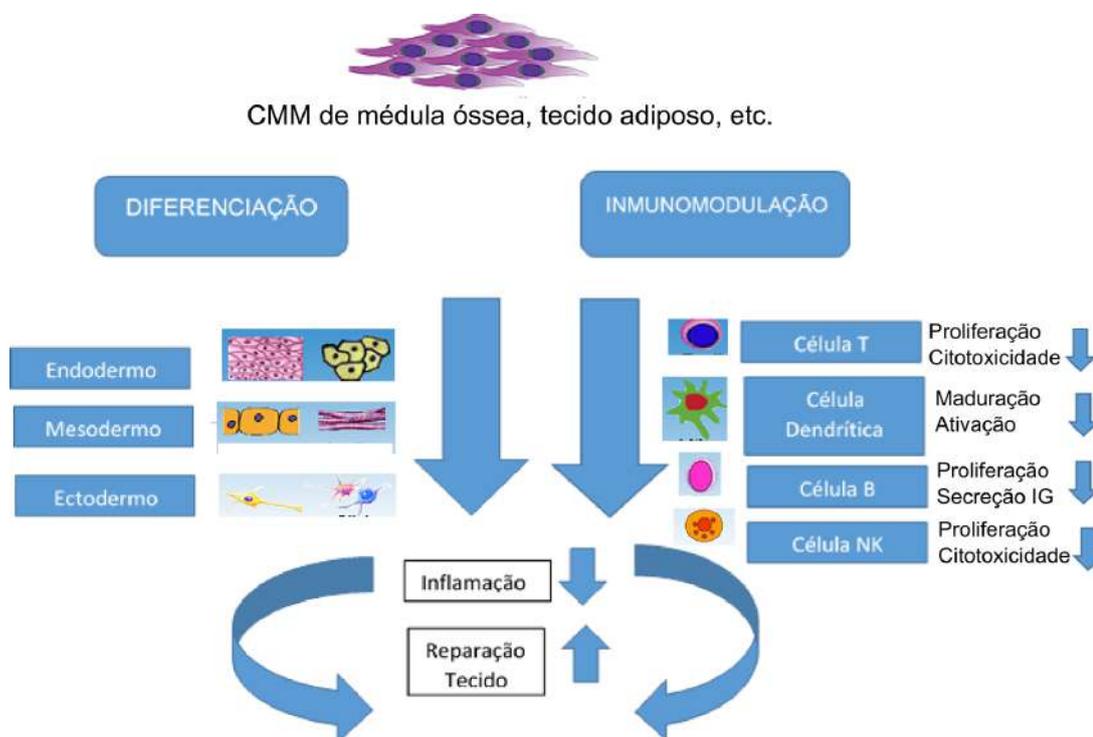


Figura 1.3 – Modelo esquemático das propriedades biológicas das CMM associadas com os seus efeitos terapêuticos (Shihua;Qu;Chunhua Zhao, 2012).

1.2 Fases do crescimento celular

As células normais em cultura possuem um padrão de crescimento representado por uma curva sigmoideal (Fig 1.4) denominada curva de crescimento. Esta curva mostra as fases de adaptação das células às condições ambientais, a disponibilidade de nutrientes e ao suporte de ancoragem necessários para promover a produção de novas células. (LÉO; GALES; SUAZO, 2008).

A determinação da curva de crescimento é importante para a caracterização de uma cultura de células. As fases de crescimento celular podem ser divididas em: fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log), fase estacionária e fase de declínio ou morte.

A fase lag é um período de adaptação, onde as células não se dividem ou o fazem em baixas taxas específicas. A duração da fase lag depende da densidade celular e do estágio de crescimento da cultura. Esta fase pode se estender de horas a alguns dias (LÉO; GALES; SUAZO, 2008). Nas culturas de células de mamífero geralmente é de aproximadamente 24 horas (SHI et al., 2009).

A fase logarítmica ou exponencial é o período no qual a multiplicação celular é máxima e constante. Nesta fase a porcentagem de células em divisão pode ser de 90 a 100%. Durante este período as células estão em seu melhor estado fisiológico assim é determinado o tempo de duplicação, que se obtém a partir do cálculo da velocidade máxima de crescimento (μ_{max}), parâmetro específico para cada linhagem.

Na literatura, tem sido reportado que a fase exponencial nas culturas agitadas tem um tempo de maior duração que nas culturas estáticas, como pode ser comprovado no trabalho de Shi e colaboradores (2010).

Ao comparar velocidades específicas máxima de crescimento celular (μ_{max}), se observam diferenças entre as linhagens; assim, as CMM de orelhas apresentam um μ_{max} de 0,0338 h⁻¹, enquanto que CMM de medula óssea apresentam um μ_{max} de 0,0117 h⁻¹, sendo ambas cultivadas em microcarregador Cultispher-S pelo mesmo método. (SART; SCHNEIDER; AGATHOS, 2009).

Na fase estacionária ou de platô, a velocidade de crescimento diminui e o número de morte celular é equivalente ao número de células novas, o que causa um decréscimo na atividade metabólica. A fase de declínio ou morte celular, apresenta uma queda drástica do número de células pois, nesta fase, o número de células mortas excede o de células novas. A construção da curva de crescimento é importante para a caracterização de certos parâmetros próprios de uma população de células sob determinadas condições de cultivo (Figura 1.4).



Figura 1.4 – Curva de crescimento padrão para células animais em cultura. (LAGES; LÉO; SUAZO; MORAES, 2007).

1.3 Metabolismo Celular

O metabolismo é um conjunto de reações bioquímicas e processos fisicoquímicos que ocorrem nas células, onde existe o consumo e geração de energia. O metabolismo divide-se em dois processos conjugados: catabolismo e anabolismo. O anabolismo são reações químicas construtivas, ou seja, produzem nova matéria orgânica nos seres vivos. Por exemplo, a síntese de proteínas no tecido muscular a partir de aminoácidos. Já o catabolismo são reações químicas destrutivas, ou seja, há uma quebra de substâncias. Por exemplo, a quebra da molécula de glicose que é transformada em energia e água. As células de mamífero, in vivo, estão adaptadas a um ambiente em homeostasia. Sendo assim, quando estas células são cultivadas *in vitro*, ou quando sofrem o processo de imortalização, encontram situações estressantes que podem modificar seu metabolismo. Estas situações provocam, basicamente, o consumo desregulado de fontes de carbono, nitrogênio e energia. (Altamirano; Gòdia; Cairó, 2008).

As CMMs têm demonstrado possuir um metabolismo semelhante às linhagens de células animais em cultura (CARUSO, 2012). Desta forma, o consumo de nutrientes e produção de metabólitos segue o mesmo padrão, tendo como principal fonte de energia a glicose. (Altamirano; Gòdia; Cairó, 2008).

Quando um mol de glicose é metabolizado via glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, produz, no final do ciclo, 30 a 38 mols de ATP. Porém, quando metabolizado pela via da glicólise anaeróbia, gera apenas 2 mols de ATP e 2 mols de lactato. Assim, tanto o consumo de glicose quanto a produção de lactato podem indicar qual via metabólica as células estão utilizando para produzir energia (SCHOP et al., 2009).

Outro componente importante no metabolismo de células de mamíferos é a glutamina, pois é responsável pela principal fonte de geração de amônio. Na maioria das linhagens celulares utilizadas industrialmente, a glutamina é consumida a uma elevada velocidade (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007).

Embora esses fatos sejam claros em cultivos de células animais, em relação ao cultivo de CMM notamos uma taxa uniformemente baixa de consumo de glicose e glutamina. Assim, estes dois nutrientes nunca chegam a limitar as concentrações em cultivo. (SART et al, 2010; SCHOP et al, 2008).

Contudo, o crescimento e a viabilidade celular são prejudicados não só pelo esgotamento dos nutrientes, mas também pelo efeito negativo causado pelo acúmulo de metabólitos, que pode ser inibitório ou tóxico, principalmente de lactato e amônio.

O principal efeito negativo do acúmulo de lactato nos cultivos é a acidificação do meio, gerando a necessidade de métodos de controle de pH. Em trabalhos com CMM de medula óssea de cabra cultivadas em microcarregador Cytodex 1, as células consomem mais glicose, o que produz mais lactato. Estas altas concentrações de lactato são provenientes do metabolismo "não eficiente" (glicose anaeróbica) da glicose, onde se obtém 2 mols de ATP e 2 mols de lactato, a partir de 1 mol de glicose. Mesmo assim não se atingiu o valor considerado como inibitório, de 35,4 mM (SHOP et al, 2008).

Os efeitos do amônio no metabolismo são observados a níveis de concentração muito mais baixos, tipicamente entre 2 e 4 mM, valores facilmente atingíveis em sistema de cultivo. Mais especificamente, foi reportado para as CMM humanas valores inibitórios de 2,4 mM (SHOP et al, 2008). O metabolismo do amônio pode diferir em cada linhagem celular, mas de forma geral, está relacionado ao efeito do transporte do NH_3 / NH_4^+ através das membranas celulares e seus efeitos no pH intracelular e extracelular. Assim, se propôs que o principal efeito do amônio sobre o crescimento celular pode ser atribuído a uma alteração do pH intracelular pelo seu acúmulo (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007).

1.4 Microcarregadores

Atualmente, no cultivo de células animais dependentes de ancoramento, o uso de microcarregadores vem crescendo. Pois além de, significar um aumento considerável da área para o crescimento, reduz os riscos de contaminação e possibilita a obtenção de uma alta concentração de células seus produtos (WEBER et al., 2007).

Os microcarregadores são esferas com diâmetro em escala de micrômetros compostas por materiais biocompatíveis para permitir a adesão celular e o crescimento de células dependentes de ancoramento (SCHOP et al., 2008).

Para o desenvolvimento de culturas utilizando microcarregadores, é importante ter em conta algumas características do mesmo, como: a área de superfície, o tamanho do grânulo, e a qualidade da adesão celular, pois esses são fatores críticos que podem modular a fixação das células e determinar o seu potencial de expansão (YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007).

Os microcarregadores podem ser classificados de acordo com o tipo de carga elétrica, composição química e porosidade (SCHOP et al., 2008).

De acordo com sua carga, os microcarregadores se classificam entre carregados positivamente, negativamente e neutros. Os microcarregadores neutros estão normalmente revestidos com colagénio, gelatina, ou tem fibronectina acoplados em sua superfície. Os microcarregadores negativos tem na superfície glicosaminoglicanos que fornecem uma carga ligeiramente negativa. Os microcarregadores carregados positivamente apresentam grupos (DEAE) N-dietilaminoetilo, como é o caso do Citodex 1.

De acordo com a sua composição química, os microcarregadores podem ser feitos de diversos materiais, como a celulose, colágeno ou gelatina, dextrana, vidro, poliestireno. (CHICO;RODRIGUEZ;FIGUEREDO, 2008). Dependendo da sua composição química são adotadas diversas estratégias para a recuperação de células viáveis após o cultivo. No caso dos microcarregadores baseados em gelatina ou colágeno, são comumente utilizadas enzimas como a tripsina ou collagenase (MALDA; FRONDOZA, 2006).

Outra característica muito importante é a porosidade, assim, os microcarregadores podem ser divididos em microporosos, quando o diâmetro do poro é menor a $1 \mu m$, permitindo o crescimento das células exclusivamente na superfície externa, ou macroporosos, quando o diâmetro do poro varia entre 10 a $50 \mu m$, permitindo também o crescimento na superfície interna (FERNANDES et al., 2007).

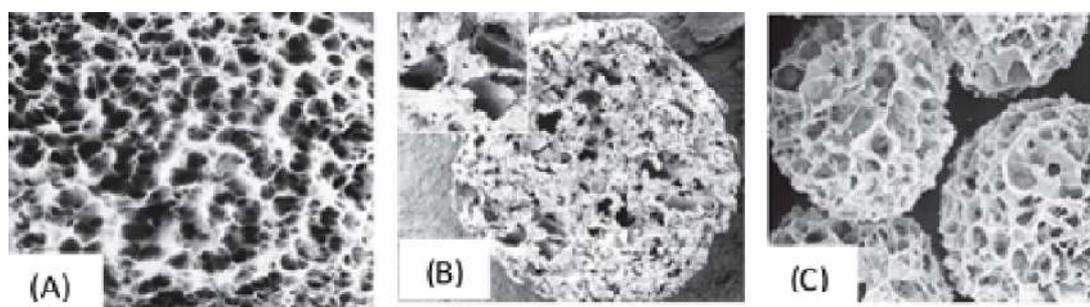


Figura 1.5 – Imagens de microscopia eletrônica de diversos microcarregadores. (A) Estrutura do Cytodex, microcarregador microporoso. (B) Estrutura do Cytoline, microcarregador macroporoso, ressaltando os poros o suficientemente grandes para permitir o crescimento das células em seu interior. (C) Estrutura do Cytopore, microcarregador macroporoso. (GE HEALTHCARE, 2005).

Tradicionalmente, as células dependentes de ancoragem são cultivadas em frascos tipo T, sendo que, as células tronco não são exceção. No entanto, devido a necessidade de um elevado número de células (como fonte celular para terapias e também como ferramentas para o estudo do desenvolvimento de doenças e processos biológicos), as culturas em suspensão utilizando microcarregadores se apresenta como uma alternativa viável, que vem sendo relatada por diversos autores na literatura, como mostra a Tabela 1.2.

Neste trabalho, foi escolhido o microcarregador macroporoso Cultispher-S (Percell Biolytica AB, SWE), pois na literatura são relatados fatores de crescimento elevados quando comparados a outros do mesmo tipo. (EIBES et al., 2010) Outras vantagens deste tipo de microcarregador é facilitar o intercambio gasoso, o monitoramento do pH, a possibilidade de análises periódicas de pequenas amostras ao o longo do cultivo e, principalmente, um aumento na taxa de recuperação celular quando utilizadas enzimas como a Tryple, o que representa um grande avanço no uso das CMMs na terapia celular.

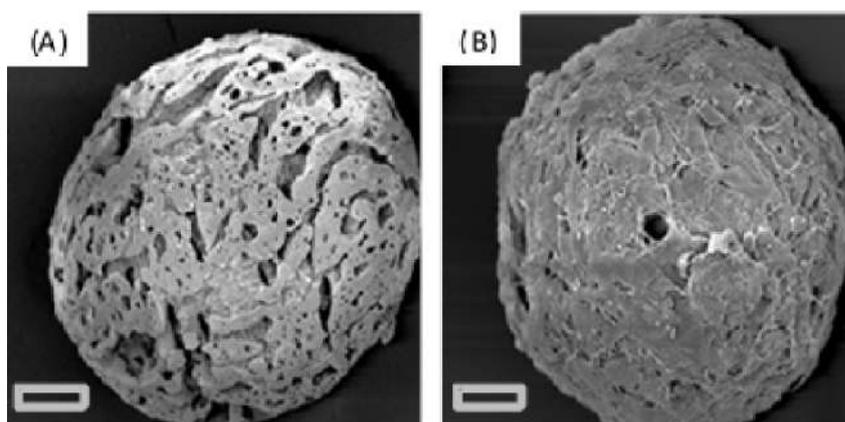


Figura 1.6 – . Imagens de microscopia eletrônica de varredura do Microcarregador Cultispher-S. (A) Microcarregador sem células. (B) Microcarregador com células estromais de rato. Escala ($40\mu m$).

Tabela 1.2 – Cultivos de CMMs com microcarregadores em frasco spinner. (adaptada de MENDONÇA, 2013).

Autor	Tipo de célula Origem Espécie	Microcarregador	Material	Carga Porosidade	Duração do cultivo	Fator de expansão
FRAUENSCHUH et al., 2007	CMMS Médula óssea Suína	Cytodex-1	Matrix de dextrana DEAE	+ + Não	28 dias	3,6
YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007	CMMS Médula óssea Ratos	Cultispher-S	Gelatina porcina	- Sim	35 dias	8,3
EIBES et al., 2010	CMMS Médula óssea Humana	Cultispher-S	Gelatina porcina	- Sim	8 dias	8,4
SANCHES, 2010	CMMS (linhagem) Médula óssea Humana	Cultispher-S	Gelatina porcina	- Sim	15 dias	9,7
SUN et al., 2010	CMMS Médula óssea Humana	Cultispher-G	Gelatina porcina	- Sim	6 dias	2,8
BOO et al., 2011	CMMS (linhagem) Médula óssea Coelho	Cytodex-1	Matrix de dextrana DEAE	+ + Não	14 dias	5,2
MIZUKAMI, 2011	CMMS Médula óssea Humana	Pronectin-F	Poliestireno + Fibronectina	+ Não	8 dias	11,2
CARUSSO, 2012	CMMS Médula óssea e veia de cordão umbilical Humana	Cytodex-3	Matrix de dextrana Colágeno DEAE	+ + Não	7 dias	3,9
MENDONÇA 2013	CMMS (linhagem) Médula óssea Humana	Cultispher-S	Gelatina porcina	- Sim	14 dias	10,2

1.5 Biorreatores

As inúmeras aplicações que vem surgindo para as CMM são limitadas, pela necessidade de um sistema de expansão que garanta a multipotencialidade celular e evite a perda da capacidade proliferativa, após um determinado número de divisões celulares. É nesse contexto que surge o uso de equipamentos e tecnologias de cultivos em biorreatores (MARTIN et al., 2004).

Os biorreatores são definidos como dispositivos mecânicos que oferecem condições ambientais e fisiológicas favoráveis para o cultivo celular (GODARA et al., 2008).

Para garantir essas condições, os biorreatores devem permitir o controle e a manutenção de diversas variáveis, como o equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultivo, controle da temperatura, troca de gases ($O_2 - CO_2$), suplemento de nutrientes (permitir troca de meios) e manutenção de assepsia (CHICO et al., 2008).

1.5.1 Classificações dos biorreatores

Os biorreatores podem ser classificados de diferentes maneiras. A Tabela 1.3 mostra um resumo das diferentes formas de classificação dos biorreatores.

Tabela 1.3 – Classificação dos biorreatores.

Critérios	Classificação
Geometria do Aparelho	Estático Agitado Perfusão
Sistema de Cultivo	Homogêneos - Heterogêneos
Regime de alimentação	Descontínuo, Descontínuo alimentado Contínuo, Contínuo com retenção de células

Uma das formas de classificação, é de acordo ao sistema de cultivo, assim eles podem ser homogêneos ou heterogêneos. Todos estes sistemas homogêneos e heterogêneos são considerados multifásicos, pois se diferenciam pelo menos duas fases: sólida (células) e líquida (meio de cultura).

1.5.1.1 Biorreatores Homogêneos

Os biorreatores do tipo homogêneos são aqueles nos quais as células se encontram suspensas uniformemente na fase líquida. Estes biorreatores oferecem a vantagem de monitorar e controlar o ambiente físico-químico ao qual está submetido a população celular de forma mais confiável que os biorreatores heterogêneos. Os biorreatores de tipo ondas e tanque agitado são os principais exemplos deste tipo de biorreator.

a. Biorreator de ondas

O sistema Wave (GE Healthcare) é um sistema de cultura composto por sacos permeáveis aos gases dispostos em uma plataforma de agitação que gera ondas, assegurando a transferência de oxigênio para o meio de cultura e uma boa distribuição dos nutrientes. Este sistema de agitação evita as zonas mortas e favorecem baixas tensões de cisalhamento (GODARA et al., 2008). Uma grande vantagem do biorreator Wave é ser um sistema estéril e descartável, sendo estas características importantes para aplicações terapêuticas. (CHICO et al., 2008) A Figura 1.8 e a Figura 1.8 mostra o sistema do biorreator Wave 2-10 (GE Healthcare).



Figura 1.7 – Biorreator Wave 2-10 (GE Healthcare).

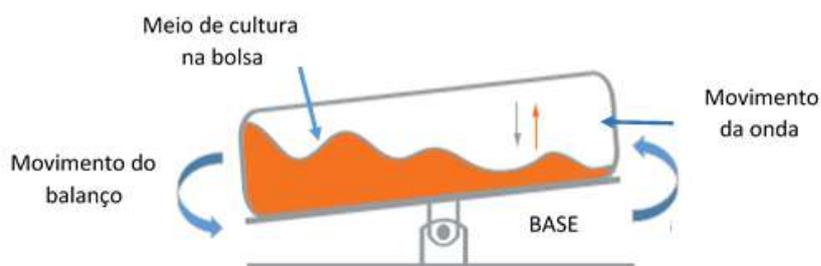


Figura 1.8 – Esquema do movimento de ondas gerado no biorreator Wave que permite a mistura de meio celular e células.

b. Tanque agitado

Estes biorreatores são muito parecidos aos fermentadores e foram os primeiros a serem utilizados na biotecnologia moderna. Trata-se de um tanque simples onde se tem impelidores que promovem a mistura do meio com as células; estes biorreatores se encontram acoplados a dispositivos padrões comerciais que medem e controlam os parâmetros básicos do processo biotecnológico, como pH, temperatura e oxigênio dissolvido (MARTIN; VERMETTE., 2005).

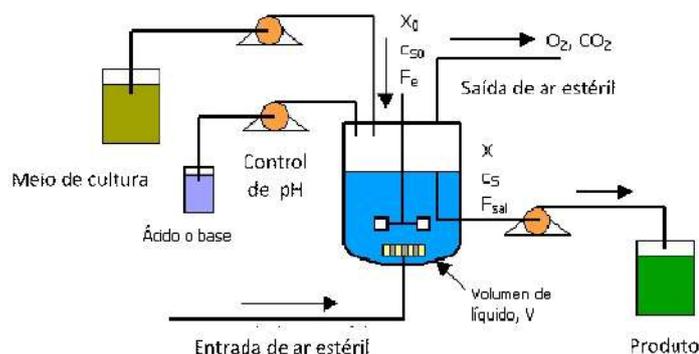


Figura 1.9 – Esquema de biorreator de tipo Tanque agitado.

<http://biorreactores.tripod.com/C7Quimioestado2.htm> Acessado em: 02 de junho de 2014.

1.5.1.2 Biorreatores Heterogêneos

Nestes biorreatores a distribuição das células não é uniforme em todo o líquido, pois elas permanecem aderidas em superfícies ou imobilizadas em leitos biocompatíveis (CHICO et al., 2008). Assim encontrase dentro deste grupo o biorreator de fibra oca e os biorreatores com crescimentos sobre superfícies como as garrafas rotatórias (rotler bottles).

a. Fibra Oca

Os biorreatores de fibra oca (hollow fiber) consistem em um cilindro que contém membranas semipermeáveis na forma de capilares (fibras ocas). As porosidades destas fibras permitem o fluxo contínuo de nutrientes líquidos e gasosos, assim como a remoção de metabólitos, proporcionando um ambiente estável para as células. As células podem ser aderidas na superfície externa das fibras no caso sejam dependentes de ancoramento ou como é mais comumente usado em suspensão no espaço extracapilar (YE et al., 2010).

Entre as principais aplicações deste biorreator estão a produção de vacinas (PRILLI-MAN et al., 1997) e anticorpos monoclonais (YAZAKI et al., 2001). Mas recentemente, ele tem sido usado nas áreas de medicina regenerativa, engenharia de tecidos e terapia celular (YE et al., 2010), (SANTOS,2013).

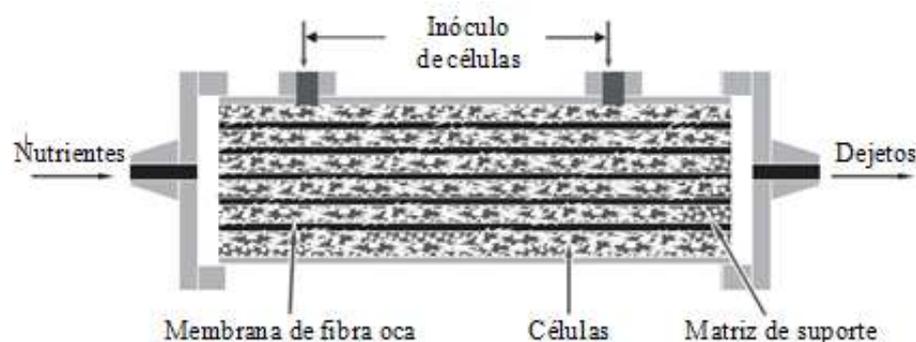


Figura 1.10 – Esquema de um biorreator de fibra oca. (YE et al., 2010).

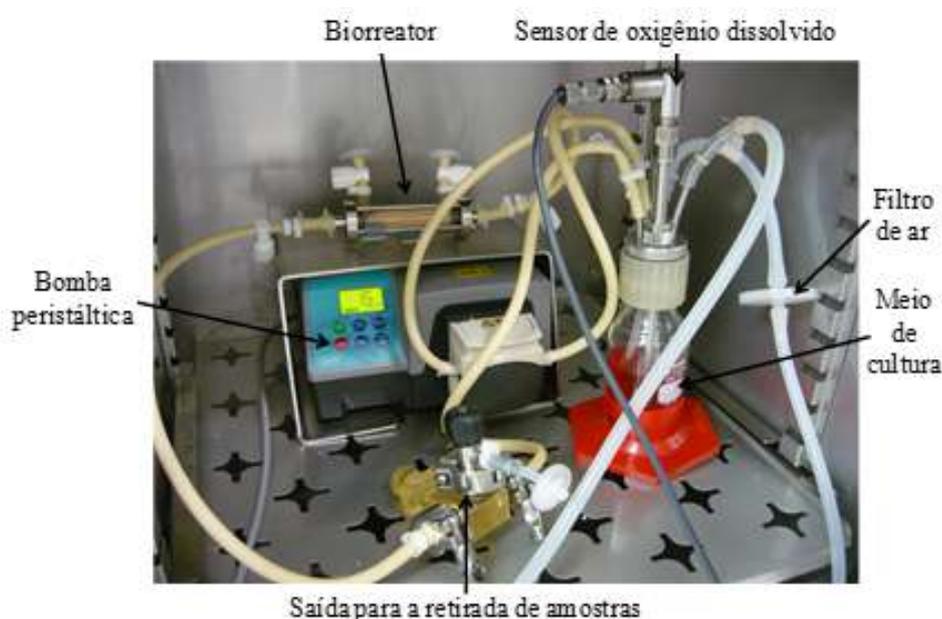


Figura 1.11 – Sistema de cultivo em biorreator de fibra oca. (SANTOS, 2013).

1.5.2 Modos de operação dos biorreatores

Uma classificação importante de conhecer nos cultivos de CMM é aquela que considera o regime de alimentação, pois o crescimento das células pode ser inibido pela escassez de nutrientes ou por excesso de metabólitos (SCHOP et al., 2008)

Assim, dependendo do regime de alimentação os cultivos podem ser:

a. Cultivo descontínuo

Também chamado de batelada, é caracterizado por manter um volume constante ao longo de todo o processo, pois o crescimento da população celular ocorre sem suplementos adicionais de substrato após a inoculação das células

b. Cultivo descontinuo alimentado

O cultivo descontinuo alimentado ou batelada alimentada se caracteriza por permitir a adição de nutrientes durante o cultivo para repor aqueles consumidos pelas células, estes cultivos são limitados pelo acúmulo de metabólitos tóxicos, como o lactato e amônio.

c. Cultivo contínuo

Estes cultivos caracterizam-se pela adição contínua de meio de cultivo e remoção de meio cultivado com células, de tal forma que se mantenha constante o volume do biorreator. Os cultivos contínuos são utilizados principalmente em atividades de pesquisa, pois é uma ferramenta de caracterização celular poderosa que permite estabelecer estados estacionários bem definidos.

d. Cultivo contínuo com retenção de biomassa

No cultivo contínuo com retenção de biomassa ou também conhecido como perfusão, há a constante adição de meio novo e remoção de meio exaurido. Entretanto, dispositivos de retenção celular são utilizados para que o meio retirado seja isento ou quase isento de células. Desta forma, a combinação da adição de nutrientes, remoção de metabólitos e retenção celular permite alcançar altas concentrações celulares (acima de 10^7 células/mL) e altas produtividades (CHICO ; RODRIGUEZ; FIGUEREDO, 2008).

1.6 Usos de biorreator de frasco spinner na expansão de células mesenquimais estromais multipotentes

O biorreator do tipo frasco spinner é o primeiro passo para o aumento de escala em comparação com a cultura estática, pois seu uso aumenta a eficiência do crescimento celular (KING; MILLER., 2007).

Devido a seu desenho e a possibilidade do monitoramento de parâmetros bioquímicos, o frasco spinner tem sido utilizado, junto com microcarregadores, na expansão de células tronco embrionárias de camundongos (FERNÁNDEZ., 2007) e com CMM de diversas espécies, como cabras (SCHOP et al., 2008), suínos (FRAUENSCHUH et al., 2007) e humanas (EIBES et al., 2010).

Um dos microcarregadores utilizados no cultivo de CMM da medula óssea suína foi o Cytodex® de diversos tipos (1,2,3); sendo o tipo 1 o que apresentou melhores resultados e, após um cultivo de 28 dias, foi comprovado o potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico (FRAUENSCHUH et al., 2007).

Em outro estudo envolvendo o Cydodex® 1 com CMM de cabra utilizando o frasco spinner foi possível monitorar o consumo de nutrientes e a produção de metabólitos, sendo possível concluir que a renovação de meio a cada 3 dias contendo microcarregadores melhorou os resultados ao renovar os nutrientes e aumentar a área de adesão. (SCHOP et al., 2008)

Também são relatados alguns trabalhos que utilizam o microcarregador Cultispher® com CMM murinas (YANG et al., 2007). Cultivos de CMM humanas também são relatados, tendo obtidos fatores de crescimento de 8,4 vezes em um cultivo que durou 35 dias, com manutenção do potencial de diferenciação e a habilidade clonogênica. Os trabalhos desenvolvidos no cultivo de CMM em microcarregadores relatam os sistemas de cultivo e o metabolismo celular, assim como a formação de agregados de microcarregadores (CARUSSO, 2012), (FRAUENSCHUH et al., 2007), (MENDONÇA, 2013). Estes agregados dificultam a recuperação celular e, em consequência, dificultam o estabelecimento de bioprocessos eficientes para aplicações terapêuticas, (CARUSSO, 2012). Apesar de terem sido relatados aspectos negativos destes aglomerados, eles também auxiliam na proliferação celular. (SANTOS et al., 2010)

Assim, este trabalho utiliza aditivos, como o sulfato de dextrana (S.D) em diferentes concentrações, como alternativa para modular o tamanho destes agregados e permitir desenvolver um cultivo de CMM de forma rentável e eficiente.

1.7 Uso de Aditivos no controle de aglomerados celulares.

A produção em grande escala de produtos biotecnológicos como proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, vacinas, etc., é permitida pela padronização de culturas em suspensão em biorreatores. No caso de células aderentes, estas necessitam serem adaptadas ao cultivo em suspensão (Murata et al, 1988). As primeiras tentativas envolvem linhagens celulares, como por exemplo, células CHO, originalmente aderentes. No estudo de Murata et al (1988) células CHO foram removidas da superfície de cultivo e colocadas num recipiente agitado contendo meio de cultura e deixadas em processo de adaptação a este novo modo de cultivo.

Esta metodologia foi eficaz parcialmente, pois as células CHO e outras linhagens (BTI-TN5B1-4 (*Trichoplusia ni*) e IPLB -SF21 (*Spodoptera trigiperda*)), frequentemente, tendem a formação de grandes agregados celulares quando em suspensão, o que se torna prejudicial para a produção por criar uma heterogeneidade da população de células, caracterizada pela morte celular por limitação do acesso dos nutrientes ao interior destes aglomerados e, em última instância, gerando a perda de produtividade. Assim a aglomeração celular pode criar um ambiente de cultura de qualidade inferior, quando são liberadas substâncias a partir da decomposição das células mortas (Renner et al., 1993).

Além destes inconvenientes, a produção de produtos biotecnológicos é normalmente operada em sistemas de perfusão, com densidades celulares constantes ao longo de toda a duração do cultivo. Isso garante um produto com alta qualidade. Neste caso o controle exato da densidade celular é crítico para a operação robusta a longo prazo de sistemas de perfusão. O controle da densidade celular em um biorreator de perfusão é normalmente realizado através de medições indiretas, como densidade ótica ou taxa de consumo de oxigênio, métodos calibrados pela contagem ou estimativa da densidade celular. É, portanto, essencial garantir uma calibração precisa da densidade celular presente no cultivo, o que não pode ser garantido com a presença de agregados celulares. (Goudar et al, 2007).

Desta forma torna-se fundamental solucionar a questão de formação de aglomerados celulares evitando a morte celular e permitindo a otimização dos processos de produção. Diferentes métodos estão disponíveis para alcançar este objetivo. As primeiras tentativas propõem o uso de aditivos, como enzimas proteolíticas (Ex. tripsina ou papaína), porém o uso destas substâncias mostrou-se ineficaz, pois comprometem a viabilidade celular (OHLSON et al., 1994).

Uma alternativa pode ser a utilização de substâncias que imitam as estruturas biológicas. Especialmente os derivados de dextrano que apresentam um certo número de compostos interessantes, por exemplo, grupos sulfonato, carboxilato, sulfamida, que são capazes de imitar o hidroxilo, carboxilato, e sulfamato de grupos sulfato sobre as cadeias de polissacáridos de heparina, que têm sido demonstradas ser essencial para a sua atividade anticoagulante (MAIGA-REVEL; CHAUBET; JOZEFONVICZ,1997).

Outras substâncias testadas com sucesso como aditivos antiaglomerantes é a suramina (naftilureia polissulfatada) que tem um amplo espectro na atividade anti-tumoral (Stein, 1993). Zanghi et al (2000) comprovou que, em cultivos de células CHO com meios livres de soro, a administração de suramina diminuiu a aglomeração celular, além disso foi reportado uma proteção contra a apoptose durante o crescimento exponencial, indicado pelo aumento na viabilidade celular de 70% para 95%. Os efeitos na aglomeração permitiram a cultura em suspensão de células livres e um ganho de 40% na produtividade (ZANGHI., et al 2000).

Em outro estudo foram testados fatores de descolamento para permitir a migração de duas linhagens de células CHO para microcarregadores porosos em processos de produção de proteínas recombinantes em larga escala. Para acelerar a colonização dos microcarregadores recém adicionados, foram utilizados reagentes de dissociação como a tripsina, papaína, Accutase, heparina e sulfato de dextrana (SD), dissolvidos em meio de cultura em baixas concentrações. Ambas linhagens celulares mostraram bons resultados com a tripsina, Accutase e SD, enquanto que a papaína não conseguiu desempenhar um papel favorável à migração das células. A velocidade de crescimento celular em microcarregadores

com 2% de SD no meio, foi de $0,25 \pm 0.02d^{-1}$ e $0,27 \pm 0.03d^{-1}$ para a CHO-MPS e CHO-K1, respectivamente. As células CHO-K1 cresceram melhor após o desprendimento, o que indica, que um dos parâmetros essenciais para o sucesso na transferência para novos microcarregadores é a distribuição uniforme de células sobre os transportadores individuais durante a fase inicial do cultivo. Quando esta distribuição é melhorada, ocorre o aumento da taxa de crescimento celular, resultando num processo mais eficiente e mais estável. (LANDAUER et al., 2002).

Nos últimos anos tenta-se entender melhor os processos de agregação celular a nível genético. Assim LUI e GODAR em 2012 testaram duas linhagens de células BHK, uma que produz agregados e outra que não agrega quando cultivadas em biorreator. Foram estudadas a expressão de genes da matriz extracelular e de moléculas relacionadas a adesão celular em diferentes estágios do processo de cultivo. Desta forma foram analisadas a expressão diferencial de genes em culturas agregadas e não agregadas. Como resultado identificaram diferenças significativas em 4 genes (COL1A1, COL4A1, THBS2, e vcan). Esta informação foi utilizada para propor dois modelos de agregação celular. O primeiro sugere que a agregação celular foi mediada por trombospondina, uma glicoproteína adesiva responsável pela formação de agregados de plaquetas aglutinados às células nucleadas. Enquanto o outro modelo propõe que as fibras de colágeno se liguem à fibronectina que pode interagir com locais de adesão para as células, o que resulta em agregados complexos. (LUI; GODAR, 2012).

Estes estudos genéticos melhoram a compreensão dos mecanismos que conduzem a agregação de células e podem levar ao desenvolvimento de linhas de células que não agreguem em cultura favorecendo a produtividade e qualidade dos produtos desejáveis, inclusive quando estes são as próprias células.

1.8 Sulfato de dextrana

Dextrana é o nome otorgado a polisacarídeos produzidos por alguns tipos de bactérias e que se formam naturalmente nos processos de produção de cana. Deste modo, a dextrana é definida como um polímero de glicose de alto peso molecular. As unidades de glicose se unem preferencialmente por ligações do tipo $\alpha - 1 - 6$, mas também podem unir-se por ligações $\alpha - 1 - 4$ (ALSOP., 1983).

Muitos organismos podem produzir dextranas, desde bactérias até fungos. No entanto, para seu uso comercial, são utilizadas somente as espécies da família Lactobacillaceae, sendo *Leuconostoc mesenteroides* e *L. Dextranicum* os principais produtores deste biopolímero. (JEANS et al., 1954). A produção da dextrana é mediada pela ação da enzima dextrana-sacarase, que utiliza como substrato a sacarose para produzir, além de dextrana, frutose. A reação pode ser observada na Figura 1.12.

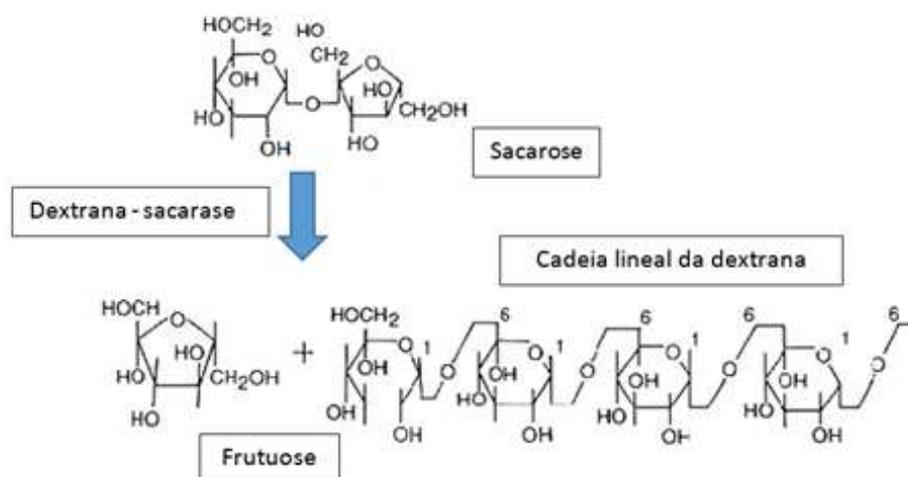


Figura 1.12 – Síntese geral das dextranas a partir da sacarose.

<http://avibert.blogspot.com/2010/06/factores-que-afectan-la-calidad-de-la.html>. Acessado em: 06 de maio de 2014.

As propriedades físicas e químicas das dextranas variam de acordo com seu método de produção e diferem entre si em peso molecular, grau e ramificação das moléculas, conteúdo de ligações glicosídicas, solubilidade em meio aquoso, atividade ótica e ação fisiológica (KARTHIKEYAN; RAKSHIT; BARADARAJAN, 1996).

As dextranas nativas, usualmente, tem pesos moleculares altos (de 2 a 40 milhões ou mais), já as dextranas clínicas, tem pesos moleculares baixos (40 a 90 mil). Essas últimas podem ser preparadas por despolimerização de dextranas nativas ou por síntese (SHAH ALI UL QADAR et al 2006).

As principais aplicações da dextrana se encontram na indústria farmacêutica,

principalmente com o objetivo de expandir o volume plasmático, melhorando a fluidez do sangue e evitando a coagulação. (LEATHERS et al., 1995; SUTHERLAND, 1996). Outras aplicações da dextrana se encontram na indústria alimentícia, onde é utilizada como espessante para compotas e sorvetes, impedindo a cristalização do açúcar e melhorando a retenção da umidade. Muitas de suas propriedades são similares aos derivados da celulose, amido, alginatos e outras gomas (MCCURDY et al., 1994).

Um dos principais derivados da dextrana é sua forma sulfatada (17-20% enxofre), também chamada de sulfato de dextrana (S.D). Esta molécula atinge altos graus de pureza e qualidade, permitindo seu uso em muitas aplicações na área da saúde e biologia molecular. Além destas características, o sulfato de dextrana (S.D) é facilmente degradado pelos sistemas ecológicos. Na literatura, são reportados efeitos anti-inflamatórios do sulfato de dextrana (PATRUSHEV; SHEKHTMAN. 1973) (GIRI et al., 1975; KOCHA et al., 1969). Já nos últimos anos, surgiram outras aplicações para esta molécula, já que quando combinada com outros biopolímeros, como alginato e quitosana pode representar um sistema de entrega eficiente para a liberação espaço-temporalmente controlada de moléculas bioativas e células, com potencial uso farmacológico (VALENTE et al., 2012).

Em estudos realizados em duas linhagens celulares BTI-TN5B1-4 (*Trichoplusia ni*) e IPLB -SF21 (*Spodoptera trigiperda*) poliânions sulfatados foram utilizados com sucesso para reduzir aglomerados em suspensão. Foram testadas muitas substâncias sulfatadas como a heparina, condritin sulfato, dermatan sulfato e o sulfato de dextrana (SD). A eficácia da indução de suspensão de uma única célula é positivamente correlacionada com o aumento de sulfatação do poliânion adicionado. (DEE., et al 1997)

Os autores propõem que a habilidade da heparina de induzir a formação celular única, pode ser uma propriedade genérica de polímeros negativamente carregados (ânions), ou pode surgir de interações específicas das células com os grupos sulfato, grupos carboxilato ou o açúcar da própria estrutura. (DEE., et al 1997).

Observou-se que ao serem testados sulfatos de dextrana de diferentes pesos moleculares, existe um incremento da toxicidade que é proporcional ao peso molecular. Sendo que SD com 500 000 PM já é considerado tóxico níveis acima de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No entanto a eficácia nos processos de desagregação celular aumenta inversamente com PM, sendo 5000 PM o mais efetivo. Outro dado importante desta pesquisa mostra que SD com 5000 PM não afeta o tempo de duplicação e a densidade máxima de células para níveis entre 25 e 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este estudo permitiu observar o grande potencial de aditivos sulfatos como o SD como agente de dispersão o que pode levar a um aumento da produção de proteínas recombinantes. Desta forma o tratamento com SD aumento quatro vezes o rendimento volumétrico da proteína recombinante glicosilada. Contudo o avanço mais importante e que as células podem ser infectadas em alta densidade, sem complicações de agregação, o que significa uma melhora considerável nos processos em grande escala.(DEE., et al 1997).

Em estudos realizados por Barabino e colaboradores (1999), foi observada adesão excessiva de hemácias falciformes ao endotélio vascular, quando comparada as normais. Esta associação pode ser explicada pela ligação das mesmas com proteínas endoteliais, como a laminina. Nestes estudos, também foi avaliada a inibição desta adesão por polissacarídeos aniônicos, entre eles o sulfato de dextrana. Foram relatados efeitos inibitórios importantes na adesão quando em presença de sulfato de dextrana de alto peso molecular (78%), mas também foram obtidos resultados promissores com sulfatos de baixo peso molecular (52%), quando comparados com outras substâncias, como a heparina (26%), e outros glicosaminoglicanos que se mostraram ineficazes. Baseado nestas experiências, é sugerido o uso do sulfato de dextrana nas culturas com microcarregadores para agir como agente inibidor de contato célula-célula, já que na formação destes aglomerados é preciso tal contato. Contudo, recomendamos testes de diversas concentrações do aditivo, pois este também pode afetar os processos de adesão das células às superfícies de ancoramento.

Outro estudo importante é o realizado por Ying e colaboradores em 2011 que contribuiu para a compreensão dos efeitos do sulfato de dextrana sobre a apoptose de células CHO. Assim foram testadas duas linhagens de células CHO que foram expostas a agentes apoptóticos, e observou-se que o SD interfere nos processos de apoptose relacionados com a via mitocondrial (liberação de citocromos) sem envolver a ativação da caspase-8. Portanto o sulfato de dextrana pode também mostrar uma ação anti-apoptótica o que proporcionaria uma grande vantagem nas condições típicas de cultura celular, como o stress oxidativo, o stress osmótico, metabólica a acumulação subprodutos e esgotamento de nutrientes, pois eles são importantes fatores indutores de apoptose (YING., et al 2011).

1.9 Comentários sobre a revisão bibliográfica

Os trabalhos analisados nesta revisão bibliográfica nos permitiu perceber que:

- a. Os avanços mais importantes para os cultivos em grande escala de CMM, envolvem o uso de microcarregadores, os quais são eficientes nos processos de adesão da célula e atingem valores importantes de crescimento celular.
- b. Um dos principais problemas enfrentados nestes sistemas de expansão é a formação de aglomerados, que acontece quando os cultivos atingem concentrações celulares altas e, conseqüentemente, é observada excessiva formação de matriz extracelular.
- c. Falta de metodologias de expansão/recuperação eficientes e de alta produtividade para o cultivo de CMM. Apesar que os estudos das CMM estão focados nas aplicações terapêuticas todos eles apontam no seu potencial de diferenciação e comportamento metabólico.
- d. O estudo de substâncias antiaglomerantes tem que ser avaliadas, pois estudos demonstram as propriedades de poliânions sulfatados nos processos de controle de aglomerados celulares. Entre as substâncias citadas anteriormente, o SD surge como um composto promissor, pois conserva a viabilidade celular e, quando comparado com substâncias com as mesmas qualidades, resulta ser o mais acessível economicamente.

Como resultado desta análise, é possível concluir que o desenvolvimento de uma metodologia eficaz para o cultivo de CMM é necessário e importante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de trabalho

Todos os procedimentos, se não se indicar o contrário, foram executados no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC), localizado no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Segue um esquema da planta do laboratório (como mostrado na Figura 2.1)

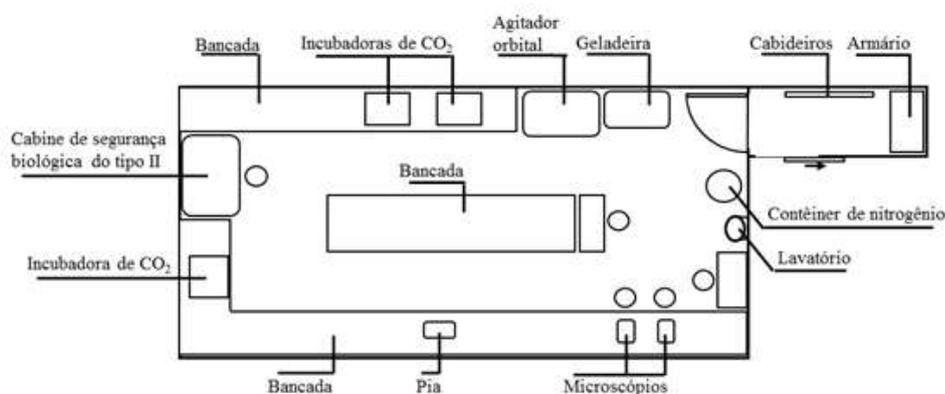


Figura 2.1 – Esquema do Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares. (Acervo pessoal).

2.2 Materiais

2.2.1 Linhagem celular

CMM, imortalizada por expressão da transcriptase reversa da telomerase (hBMSC-TERT), uma proteína catalítica da telomerase que impede o encurtamento dos telômeros após cada ciclo celular, que pode ser usada para gerar linhagens de células capazes de se expandir indefinidamente (MIHARA et al., 2001). Esta linhagem também possui a expressão de GFP (Green Fluorescent Protein), proteína que apresenta fluorescência verde quando atingida por luz ultravioleta, o que permite a visualização de células vivas quando utilizado um microscópio adequado (TSIEN, 1998). Esta linhagem foi concedida pelo Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas e pela equipe do Centro Regional de Hemoterapia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). As células foram armazenadas em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso.

2.2.2 Meios de cultivo

2.2.2.1 Meio α -MEM

Para a expansão das CMM foi utilizado o meio α -MEM (Minimum Essential Medium) (GIBCO, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (HyClone®, THERMO SCIENTIFIC, EUA), Hepes (SIGMA-ALDRICH, EUA), bicarbonato de sódio (SIGMA-ALDRICH, EUA), L-glutamina (SIGMA-ALDRICH, EUA), L-arginina (SIGMA-ALDRICH, EUA), e penicilina/estreptomicina (GIBCO, EUA). Para as análises de determinação indireta da densidade celular foi utilizado meio α -MEM sem vermelho de fenol (CUTILAB, BRASIL). Os detalhes da suplementação do meio podem ser observados na 2.1

Tabela 2.1 – Componentes do Meio α -MEM com vermelho de fenol utilizado no cultivo da linhagem celular hMSC-TERT.

Componente	Concentração	Fabricante
α -MEM com vermelho de fenol	10,20 g/L	Gibco, EUA
Soro fetal bovino	0,15 L	HyClone®, Thermo Scientific, EUA
D-glicose	2 g/L	Sigma-Aldrich, EUA
L-glutamina	0,37 g/L	Sigma-Aldrich, EUA
L-arginin a	0,44 g/L	Sigma-Aldrich, EUA
HEPES	4,29 g/L	Sigma-Aldrich, EUA
Bicarbonato de sódio	1,26 g/L	Sigma-Aldrich, EUA
Penicilina	5000 μ g/mL	Gibco, EUA
Estreptomicina	5000 μ g/mL	Gibco, EUA
Água ultra pura	1L	Millipore,Alemanha

2.2.2.2 Meio de Congelamento

Meio composto de 90% (v/v) de soro fetal bovino (HyClone®, THERMO SCIENTIFIC, EUA) e 10% (v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido, SIGMA-ALDRICH, EUA). Para garantir a esterilidade, o meio foi filtrado com membranas de polietersulfona assimétrica de 0,22 μ m de poro estéril. (Millipore,Alemanha).

2.2.3 Corante

Solução aquosa de azul de tripan 0,45% (v/v) (GIBCO, EUA), foi utilizada na determinação da viabilidade celular no hematocitômetro. Este corante também foi utilizado na análise do diâmetro de aglomerados, com o objetivo de corar os microcarregadores Cultispher-S e aumentar o contraste em relação ao fundo da lâmina.

2.2.4 Enzimas de dissociação celular

A enzima Tryple (GIBCO, EUA) foi utilizada para a dissociação entre as células e a superfície dos frascos T, e para a dissociação entre as células e os microcarregadores Cultispher-S foi utilizada a enzima Tryple Select 10X (GIBCO, EUA).

2.2.5 Microcarregadores

O microcarregador utilizado nos cultivos foi o Cultispher[®]-S (Sigma-Aldrich,EUA), um microcarregador macroporoso de gelatina suína. Seu uso com MSC já foi relatado na literatura (YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007; EIBES et al., 2010) e em estudos realizados no LATECC (SANCHES, 2010; MENDONÇA, 2013). Suas características físicas são detalhadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Principais características do microcarregador Cultispher[®]-S.

Características	Valores
Densidade (g/mL)	1.04
Diâmetro (μm)	130- 380
Média do diâmetro de poro (μm)	20

2.2.6 Solução antiaderente

A solução Sigmacote[®] (SIGMA-ALDRICH, EUA) foi utilizada para impedir a adesão das células e/ou dos microcarregadores nas paredes do biorreator, formando um filme neutro e hidrofóbico com o vidro. Se utilizou 1ml da solução, a qual foi espalhada pelas paredes do spinner e no impelidor. Após sua utilização esperou-se no mínimo 1 hora para garantir a evaporação completa da solução Sigmacote[®] e, após este procedimento, se procedeu a esterilização do frasco spinner.

2.2.7 Reagente MTT

Foi utilizado o kit baseado no método do MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5 difeniltetrazólio) (SIGMA-ALDRICH,EUA) para a determinação indireta da densidade de células viáveis nos cultivos no biorreator. O método se baseia no fato que, nas células metabolicamente ativas, a enzima mitocondrial desidrogenase reduz o reagente MTT (amarelo) ao formazan (roxo). Quando os cristais de formazan são solubilizados, é gerada uma solução, que por meio da análise de espectrometria no comprimento de onda de 570nm, permite determinar a concentração de células vivas.

2.2.8 Frasco de Cultura.

Para a expansão das células em culturas estáticas, foram utilizados frascos de cultura celular (Fracos T) de poliestireno com área superficial DE 75 cm² (TPP, SUÈCIA).

2.2.9 Frasco Spinner

Foi utilizado nos cultivos em microcarregador, o frasco tipo Spinner de 100mL (BELLCO,EUA), que é um recipiente de vidro com geometria cilíndrica (tipo tanque), que possui um impelidor central de vidro e braços laterais.

2.2.10 Sulfato de dextrana

O Sulfato de dextrana foi utilizado como aditivo nos experimentos 1,3,4,5,6 e 7 com o intuito de verificar sua influência na formação de aglomerados nos cultivos com microcarregadores Cultispher-S. As características deste produto estão relatados na Tabela 2.3

Tabela 2.3 – Principais características do Sulfato de Dextrana.

Nome	Dextran sulfate sodium salt
Fabricante	Sigma-Aldrich, EUA
Fonte	Leuconostoc ssp
Massa Molecular	6,500-10,000

2.2.11 Anti-aglomerante

O *Anti-clumping* (GIBCO, EUA) foi utilizado como aditivo nos experimentos 8 e 9. É um reagente concentrado que reduz a aglomeração de células para auxiliar na obtenção de altas densidades celulares viáveis, de culturas de células em suspensão. O fabricante determina que é quimicamente definido e não contém componentes de origem animal, proteínas, enzimas, hidrolisados ou componentes de composição desconhecida.

2.3 Métodos para o cultivo celular

2.3.1 Preservação celular

As células foram preservadas em tubos de criogenia em nitrogênio líquido a -196 °C. Para o congelamento, as células foram retiradas de culturas em fase de crescimento exponencial e centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de congelamento, composto de 90% (v/v) de soro

fetal bovino (HyClone®, THERMO SCIENTIFIC, EUA) e 10% (v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido), (SIGMA-ALDRICH, EUA). As células foram colocadas em uma densidade de 1.10^6 cel.mL⁻¹ em cada criotubo. Estes criotubos foram colocados num recipiente contendo álcool isopropílico para garantir a taxa de congelamento constante de -1 °C por minuto e congelados em *ultrafreezer* durante 24 horas. Após este procedimento, foram então armazenados em nitrogênio líquido.

2.3.2 Ativação Celular

Para ativação das células o tubo de criogenia foi retirado do nitrogênio líquido e, após o descongelamento a temperatura ambiente, a suspensão de células foi transferida para um tubo tipo falcon de 15mL (BD, EUA) contendo 9 mL de meio de cultura e centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O meio de cultura foi descartado para remoção do DMSO e o pellet de células ressuspenso em meio de cultura foi transferido para uma garrafa de cultura de 75 cm² (TPP, SUÈCIA).

2.3.3 Cultivo estático em frascos T

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em frascos T e mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ até atingir confluência de no máximo 80%. Conforme a confluência foi atingida iniciou-se o procedimento de expansão de um frasco T para outros dependendo do número de células disponível. Assim em primeiro lugar, o sobrenadante foi retirado e as garrafas foram lavadas com uma solução de PBS estéril, em seguida foram adicionados 4 mL de Tryple TM e mantidos por 5 minutos em incubadora a 37 °C para que as células consigam desaderir da superfície do frasco T. A ação da enzima foi interrompida após a adição de 12 mL de meio de cultura. O conteúdo do frasco T foi transferido pra um falcon e centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspendidas em meio de cultura. Foi retirada uma alíquota de 100 μL para realizar a contagem utilizando-se o método de exclusão do corante azul de tripan. Em seguida, inoculou-se 4.10^5 células em cada garrafa de 75 cm² contendo 15 mL de meio de cultura. As passagens continuavam até as células atingirem um número mínimo de $6,25.10^6$, para o preparo do inóculo do biorreator. Foi definido o uso de, no mínimo, quatro frascos de 75 cm² para atingir este objetivo.

2.3.4 Cultivos em frasco spinner

Após os procedimentos de descongelamento e cultivos em frascos T, se realizou a expansão das células em frasco spinner. A Figura mostra as etapas realizadas ao longo do cultivo.

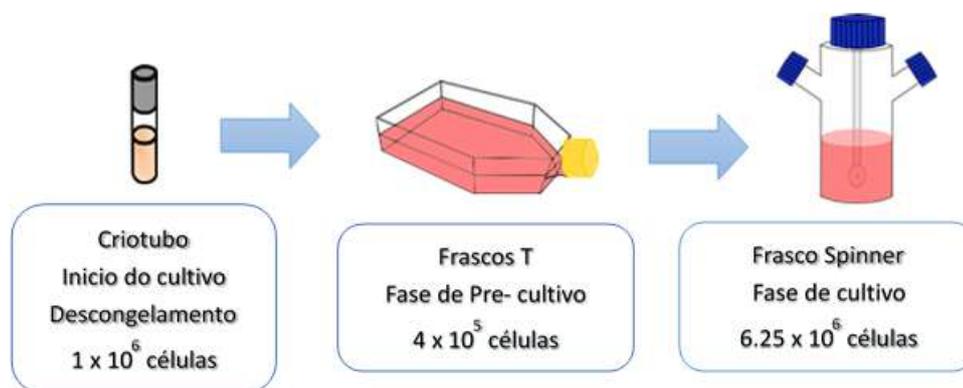


Figura 2.2 – Esquema completo de cultivo das células hMSC-TERT para realização de experimentos em frasco spinner. (Acervo pessoal).

As etapas pré-experimento aconteceram entre as 48 e 24 horas antes do inóculo, nas quais o frasco spinner foi preparado aplicando-se 1 mL de Sigmacote[®] nas suas paredes internas afim de impedir a adesão das células nos frasco e logo após um período de secagem foi esterilizado em autoclave. Os microcarregadores foram pesados em um falcon (0.150 g do microcarregador Cultispher[®], que corresponde a 3,0 g/L), adicionou-se 7,5 mL de PBS e esse conteúdo foi levado para a autoclavagem. Após a esterilização, na câmara de fluxo laminar, o PBS foi descartado e adicionou-se 10 mL de meio de cultura α -MEM. Os microcarregadores foram armazenados na geladeira até o momento do inóculo no spinner.

Dessa forma, após atingir o número de células necessário para o início do experimento ($6,25 \cdot 10^6$ células), estas foram inoculadas num frasco Spinner já contendo meio e o microcarregador. O volume de trabalho para todos os experimentos foi de 50 mL e o spinner foi mantido na incubadora a 37 °C com 5% de CO₂.

Os cultivos foram divididos em 2 fases: a fase de adesão e a fase de expansão celular, ou de crescimento. A fase de adesão durou as 8 horas iniciais, onde aplicou-se uma agitação de 40 rpm por 30 segundos a cada 15 minutos. Após esse período, aumentou-se em 10 rpm a agitação a cada hora, a partir de 20 rpm, até atingir 10 horas de cultivo. Na fase de expansão, a agitação foi mantida constante a 40 rpm e foi feita a troca de 50% do volume total do meio de cultivo (25 mL) após 24 horas de cultivo, com o objetivo de diluir os metabólitos tóxicos (lactato e amônia), repor os nutrientes que foram esgotados e evitar os valores de pH nocivos para as células.

Para acompanhar o desenvolvimento do cultivo, após o fim da fase de adesão e a cada 24 horas, foram retiradas amostras para verificar o pH, realizar os procedimentos

de quantificação celular e separar as amostras para as análises de aminoácidos, amônia e carboidratos. A cada 24 horas foram retirados 2 mL de meio contendo os microcarregadores. Este procedimento realizou-se em duplicata antes e depois das troca de meio. Os 2 mL obtidos do spinner foram filtrados com uma pipeta de 5 mL que contém um filtro acoplado na ponta (membrana de 100 μm de poro, BD, EUA) para separar o sobrenadante dos microcarregadores. Os microcarregadores foram ressuspensos no mesmo volume (2 mL) de meio de cultura α -MEM (CUTILAB, BRASIL) sem o indicador vermelho de fenol. Do sobrenadante separado, separou-se 1 mL para as análises de amônia e 250 μL para as análises de carboidratos e aminoácidos respectivamente. Esses volumes foram congelados para a realização das análises. Do sobrenadante, foi também retirado 40 μL para quantificar as células livres na suspensão utilizando o método de exclusão pelo corante azul de tripan. Das amostras contendo o microcarregador e o meio de cultura α -MEM (CUTILAB, BRASIL) sem o indicador vermelho de fenol, foram retiradas amostras de 500 μL para realizar a quantificação determinada pelo método de MTT. Também foram retiradas amostras de 500 μL para as análises de imagens da microscopia ótica e 250 μL de fluorescência para o acompanhamento do crescimento das células no cultivo. Após realizadas essas análises, o restante da amostra é utilizado para realizar a análise de aglomerados.

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Análise de densidade e viabilidade celular

Para a análise de viabilidade e densidade de células foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan (solução 0,4%, GIBCO, EUA) (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). A densidade celular foi determinada pela contagem em hemocitômetro. Foram retiradas alíquotas de 20 μL , onde se acrescentou 20 μL de uma solução etílica 0,4% (m/v) azul de tripan preparada previamente. Após agitação, a mistura foi depositada no hemocitômetro para a contagem com auxílio de um microscópio modelo BX51 Olympus (Japão). Este processo foi repetido a fim de obter uma estatística que representasse melhor a realidade. Foram contados 16 quadrantes (8 quadrantes/câmara) para diminuir os erros de contagem e para o cálculo da média aritmética das células vivas (não coradas) e mortas (coradas em azul). A densidade celular total foi calculada pelo somatório do número de células não coradas (viáveis) com o número de células coradas (não viáveis), multiplicado pelo fator de diluição (FD) e pelo volume de um quadrante da câmara de Neubauer, como mostra a Equação 2.1.

$$DensidadeCelular \left(\frac{células}{mL} \right) = \frac{(n_v + n_d) * FD}{10^{-4}} \quad (2.1)$$

A viabilidade celular foi calculada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células total no meio (células viáveis e inviáveis) multiplicados por 100 como mostra a Equação 2.2.

$$Viabilidade(\%) = \frac{n_v}{n_v + n_d} * 100 \quad (2.2)$$

Onde:

n_v = número de células viáveis;

n_d = número de células não viáveis;

FD = Fator de diluição;

Observação: Volume de um quadrado grande da Câmara de Neubauer = 10^{-4} mL (1mm x 1mm x 0,1mm = 0,1 mm³ = 10^{-4} mL).

2.4.2 Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max})

Para realizar o cálculo de μ_{max} , precisamos fazer o gráfico dos valores com o número de células obtidas nos diferentes experimentos representadas na escala Log 10.

Na análise deste gráfico, será identificada a fase de crescimento exponencial (traçado de uma reta pelos valores com esse comportamento).

Após a identificação desta fase, será realizado o cálculo da velocidade específica de crescimento celular, conforme a Equação 2.3, para cada ponto presente na reta. Para o cálculo deste parâmetro é importante ter em consideração os valores medidos antes e depois da troca de meio.

$$\mu = \frac{Ln(N_{t_2}/N_{t_1})}{t_2 - t_1} \quad (2.3)$$

Onde:

μ = velocidade específica de crescimento

N_{t_1} = número de células no tempo 1

N_{t_2} = número de células no tempo 2

t_1 = tempo 1

t_2 = tempo 2

2.4.3 Cálculo do fator de diluição (FD)

Entende-se como fator de diluição, o valor que será multiplicado ao número de células em cada processo de amostragem tendo em consideração a retirada das amostras de 2 mL (meio + microcarregadores com células) anteriores, ou seja, este novo valor representa o número de células caso o cultivo não fosse diluído a cada amostragem (já que as reposições dos 2 mL foram feitas apenas com meio de cultura, sem microcarregadores). Para o cálculo do número de células com a correção do FD a cada amostragem se utilizou a seguinte fórmula:

$$NC_{(FD)} = \frac{NC \times cm^0}{cm} \quad (2.4)$$

Onde:

NC = Número total de células

$NC_{(FD)}$ = Número total de células multiplicado pelo fator de diluição

cm^0 = concentração inicial de microcarregador

cm = concentração de microcarregador

2.4.4 Determinação da densidade celular total pelo método baseado no MTT

Utilizou-se o método colorimétrico do MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) sugerido pela primeira vez por Mossman (1983), para quantificação da população viável de células aderidas. Este método se baseia na atividade da enzima mitocondrial desidrogenase que reduz o MTT (amarelo) ao formazan (roxo).

Para a aplicação do método baseado no MTT foi necessária a preparação de uma curva de calibração da densidade celular em função da absorbância antes de iniciar um experimento de expansão de CTMs.

Para a reação, foram adicionados 50 μ L de reagente do MTT em 500 μ L de amostra, e a mistura foi homogeneizada e colocada na incubadora de CO₂ a 37 °C por 4 horas.

Durante esse período, a cada hora a amostra foi agitada manualmente para garantir a homogeneização da mesma com o reagente do MTT. Após o período de incubação, foi adicionado 500 μ L de solução de solubilização do cristal de formazan azul escuro. Em seguida, a amostra foi centrifugada para a sedimentação dos microcarregadores e dos restos celulares e o sobrenadante foi analisado em triplicata, no espectrofotômetro de placas de 96 poços. A Figura 2.3 mostra o fenômeno descrito.

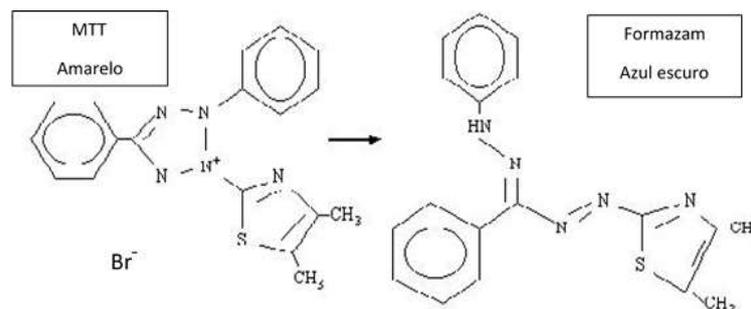


Figura 2.3 – Representação da reação enzimática em que se fundamenta o método do MTT.

2.4.5 Análises de nutrientes e metabólitos

Durante o experimento foi feita a retirada de amostras do sobrenadante, que foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior análise de níveis de glicose, lactato, aminoácidos e amônia. A análise de aminoácidos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada no método proposto por Henrikson & Meredith (1984). Foi utilizada uma coluna pico-tag (Waters, IRL) como fase estacionária e como eluente foi utilizado um gradiente constituído por duas fases móveis (A e B). A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado 17,86 g/L (J. T. Baker, EUA), trietilamina 0,047% v/v (SIGMA-ALDRICH, EUA), EDTA 0,0188% v/v e acetonitrila 6% v/v (Panreac, ESP) em água ultrapura tipo 1. A fase B contém acetonitrila 60% v/v e EDTA 0,02% v/v em água ultrapura tipo 1. As condições de operação do cromatógrafo da Waters foram: temperatura de 36°C , tempo de corrida de 45 minutos e gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm. As amostras do sobrenadante do cultivo foram preparadas segundo as etapas de filtração, secagem, reidratação, derivatização até sua diluição em tampão antes de sua injeção no equipamento. Foi preparada uma curva padrão a partir do padrão da Waters. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

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

As análises de amônia foram feitas nas amostras do sobrenadante do meio de cultivo com eletrodo íon seletivo. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A, foi utilizado para obter as medidas de milivoltagem. Foi preparada uma curva padrão a partir de uma solução padrão contendo amônia (cloreto de amônia - SIGMA-ALDRICH, EUA).

2.4.6 Recuperação das células aderidas aos microcarregadores

Ao término do cultivo foi utilizada a enzima Tryple Select 10X (GIBCO,EUA) para a recuperação das células do microcarregador Cultispher-S®. Os microcarregadores no meio de cultura foram centrifugados a 1600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. A enzima foi adicionada para garantir a dissociação celular e a mistura foi mantida por 5 minutos a 37 °C em banho termoeletrônico até a dissolução da matriz de gelatina do Cultispher-S. Após esse período, as células em suspensão foram quantificadas por meio do método de exclusão pelo corante azul de tripan em hematocitômetro. A porcentagem de células recuperadas foi obtida por meio de uma regra de três simples, tendo como base (100%) o número de células viáveis obtido pelo método do MTT.

2.4.7 Análise de diâmetros médios dos aglomerados de microcarregadores

Para realizar esta análise, adicionou-se 20 μ L de solução aquosa de azul de tripan 0,4% (m/v) (GIBCO,EUA) às amostras retiradas durante o cultivo para corar os microcarregadores. Utilizou-se o microscópio invertido modelo CK30 (Olympus, Japão) e a câmara modelo DMC- LS 80 (Panasonic, Japão).

As imagens foram transferidas para o software Image Pro Plus, empregado para selecionar os aglomerados e calcular o diâmetro médio de cada um. Foram analisadas 40 aglomerados por amostra, para assim calcular a média aritmética e o desvio padrão.

2.4.8 Análises de Imagens

A documentação das imagens foi realizada utilizando a câmara modelo DMC- LS 80 (PANASONIC, JAPÃO). A obtenção das imagens com fluorescência foi possível uma vez que a linhagem hMSC-TERT possui a proteína GFP, que emite fluorescência na zona verde do espectro visível. O microscópio utilizado foi o BX51 (OLYMPUS, JAPÃO).

Para as imagens sem fluorescência, foi utilizado o microscópio invertido, modelo CK30 (OLYMPUS, JAPÃO). Estas imagens foram obtidas após o tratamento da amostra contendo os microcarregadores com células com o reagente do MTT, depois de 4 horas incubadas a 37 °C.

2.4.9 Análises de Citometria de fluxo

No final do cultivo, as células recuperadas do microcarregador Cultispher-S® foram descongeladas e cultivadas em frasco T até atingir 80% de confluência. Logo após este processo, as células foram desaderidas com a enzima Tryple™ Express (GIBCO, EUA) e divididas em alíquotas de 100 μ L de PBS com $2,5 \times 10^5$ células. Em seguida, foi realizada a imunomarcagem com os seguintes anticorpos monoclonais por 15 minutos

a temperatura ambiente e com a ausência de luz: Anti-CD73-PE, Anti-CD105-PerCP, Anti-CD90-PE, Anti-CD31-PE ou Anti-CD34-PE, Anti-CD45-APC, Anti-CD14-PE e anti-HLA-DR (PerCP). Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS para a análise no citômetro de fluxo (FASCalibur BD, EUA) utilizando o software CELLQuest™. As análises foram realizadas no laboratório de Citometria de fluxo do centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto.

2.4.10 Diferenciação celular

As células provenientes das etapas pré e pós cultivo em microcarregadores foram induzidas a diferenciação em adipócitos e osteócitos. Este processo consistiu em suplementar o meio de cultura com indutores específicos para cada tipo de diferenciação. Em uma microplaca de 24 poços, foram inoculados $4 \cdot 10^4$ células por poço com meio suplementado correspondente a cada tipo de diferenciação.

A placa de poços foi mantida a 37 °C com 5% de CO₂. O processo de diferenciação foi dividido em três etapas: adesão, pré-indução e diferenciação. Os detalhes de cada tipo de cultivo foram descritos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Detalhes dos processos realizados na diferenciação celular.

	Adesão	Pré-indutora	Diferenciação
Tipo de meio			
Duração	24 horas	10 dias	14 dias
Suplementação	—	Osteócitos: 10^{-8} M de dexametasona 50 mM de ácido ascórbico-2-fosfato. Adipócitos: 10^{-8} M de dexametasona 5 μ M rosiglitazona.	Osteócitos: 2 mM de β -glicerolfosfato Adipócitos: 2.5 mg.mL ⁻¹ de insulina
Troca de meio	—	Metade a cada 2 a 3 dias	Metade a cada 2 a 3 dias

No caso dos osteócitos, aproximadamente após 28 dias de cultivo, foi realizada a coloração, assim os poços foram lavados com PBS e incubados em solução contendo 5% de nitrato de prata por 30 minutos protegido da luz. Após esse período as culturas foram lavadas com H₂O destilada e neutralizadas com uma solução contendo 2% de tiosulfato de sódio. O excesso de nitrato de prata foi removido com lavagens com água destilada. As amostras foram então analisadas em microscopia ótica, e a diferenciação em osteócitos foi evidenciada pelo acúmulo de cristais de oxalato de cálcio corados com Von Kossa. Para os adipócitos, os poços foram lavados com PBS e corados com Sudan II por 5 minutos. Em seguida, foi feita a lavagem com água destilada e fixados em álcool 70% (v/v). As amostras foram então analisadas em microscopia ótica, a diferenciação em adipócitos foi caracterizada pela formação de gotículas de gordura coradas em vermelho.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de condições de cultivo

Para a definição de parâmetros iniciais do cultivo como o tipo de meio, microcarregador, quantidade de inóculo foram levados em conta trabalhos anteriores realizados no LATECC. (MENDONÇA, 2013); (MIZUKAMI, 2011); (SANCHES, 2010).

Assim foram definidas as seguintes condições para todos os cultivos em frasco spinner, como mostra a 3.1.

Tabela 3.1 – Condições iniciais para cultivos em frasco spinner.

Inóculo	1,25 x 10 ⁵ células/mL
Microcarregador	Cultispher- S 3g/L
Meio de cultivo	α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB.
Volume de trabalho	50 mL
Glicose	1g/L
Glutamina	0,36 g/L
Arginina	0,43 g/L

Os cultivos da linhagem hMSC-TERT foram mantidos a 37 °C, e neles se reconhecem duas fases no cultivo, a fase de adesão (com agitação intermitente durante 8 horas, de 15 em 15 minutos por 30 segundos a 40 rpm) e a fase de crescimento onde se mantém uma agitação constante de 40 rpm.

É importante mencionar que a agitação intermitente durante a fase de adesão tem como objetivo aumentar o contato entre as células e os microcarregadores e permitir uma adesão eficiente.

Na literatura existem relatos de diversas formas de agitação durante a fase da adesão, assim alguns preferem uma agitação intermitente (FERNANDES et al., 2007; FRAUENSCHUH et al., 2007; SCHOP et al., 2008) já outros autores preferem um sistema em repouso durante as primeiras horas (WEBER et al., 2007; YANG; ROSSI; PUTNINS,2007).

Com intervalos de 24 horas em cada experimento foram realizadas trocas de meio de cultura. Este regime de reposição de meio é importante para alcançar densidades celulares elevadas, pois a cada troca ocorre disponibilização de nutrientes essenciais e redução do acúmulo de metabólitos (tóxicos).

Estas trocas de meio são relativamente fáceis em volumes pequenos (50, 100 mL), mas se tornam excessivamente custosas em larga escala. Esse fato levou alguns autores a pesquisar sistemas de alimentação (EIBES et al, 2010.; SART et al, 2009.; SCHOP et al, 2010.; SUN et al., 2010).

3.2 Planejamento dos experimentos

A Tabela 3.2 mostra um resumo do conjunto de experimentos realizados em ordem cronológica com a finalidade de avaliar a expansão de CMM em frasco Spinner.

Para avaliar o efeito dos aditivos Sulfato de dextrana e Anti-aglomerante, tornou-se necessário a realização de um trabalho exploratório para a definição das concentrações ideais utilizadas nos experimentos em frasco Spinner. Assim, nos experimentos 1 e 8 foram utilizadas placas de poliestireno de 24 poços, onde foram testadas 3 concentrações dos aditivos mencionados, além do controle.

Os experimentos 2 e 6 são denominados de controles pois os meios de cultura não foram enriquecidos com aditivos. Nos experimentos 3 e 4 foram adicionadas, após as 24 horas, meio α -MEM contendo 0.05% de Sulfato de dextrana. Nos experimentos 5 e 7 foi adicionado, após as 24 horas, meio α -MEM contendo 0.01% de Sulfato de dextrana. No experimento 9 foram adicionados, após as 24 horas, meio α -MEM contendo o aditivo anti-aglomerante em uma diluição de $1/10^4$ (v/v).

Tabela 3.2 – Resumo dos experimentos realizados.

EXPERIMENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EQUIPAMENTO	Placa de poço	Frasco Spinner	Placa de poço	Frasco Spinner						
INÓCULO (TOTAL CÉLULAS)	DE 1×10^5	6.25×10^6	1×10^4	6.25×10^6						
VOLUMEM DE TRABALHO (ML)	1	50	50	50	50	50	50	50	1	50
DURAÇÃO (HORAS)	72	240	144	144	144	264	240	72	240	
ADITIVOS	SD	Não	SD	SD	SD	Não	SD	Anti-Clumping	Anti-Clumping	
CONCENTRAÇÃO DE ADITIVOS	1% 0.1% 0.01%	-	0.05%	0.05%	0.01%	-	0.01%	$1/10^2$ $1/10^3$ $1/10^4$	$1/10^4$	

Foram realizadas análises de densidade e viabilidade celular em hematocitômetro para todos os cultivos. Análises de MTT, CLAE, YSI foram realizados para todos os cultivos em spinner. Análises de eletrodo íon seletivo para a determinação da amônia foi realizado para todos os cultivos em frasco spinner com exceção do experimento 9.

3.3 Experimento 1

Este experimento foi realizado com o objetivo de definir as concentrações de SD em experimentos em frasco spinner em placa de poliestireno de 24 poços, com um inóculo de 1×10^5 células.

Foram testadas 3 concentrações de SD baseados em experimentos prévios realizados no LATECC (MENDONÇA, 2013).

A Figura 3.1 apresenta os resultados obtidos em três dias de cultivo de três concentrações diferentes de SD. Após 24 horas, as concentrações de 1% e 0,1% de S.D apresentaram uma queda significativa no número de células, o que evidencia a influência do SD nos processos de adesão.

Já os grupos controle e 0,01% SD, apresentaram número de células similares após as 24 horas iniciais. No entanto, apesar da queda inicial apresentada nas concentrações de 1% e 0,01% de SD, as células que conseguiram aderir cresceram. Contudo, este crescimento não foi suficiente para atingir os valores de número total de células apresentados pelo grupo controle e 0,01% de SD.

Este experimento em placa foi de caráter exploratório e permitiu comprovar o efeito negativo do S.D. na adesão celular, razão pela qual este será adicionado aos cultivos após 24 horas, garantindo assim uma fase de adesão eficiente.

Baseado nestes resultados, decidiu-se pela utilização da concentração de 0,01% SD para os cultivos em frasco spinner. Entretanto, também foram testadas concentrações maiores. Assim, serão apresentados experimentos em frasco spinner com 0,05% S.D e 0,01% S.D.

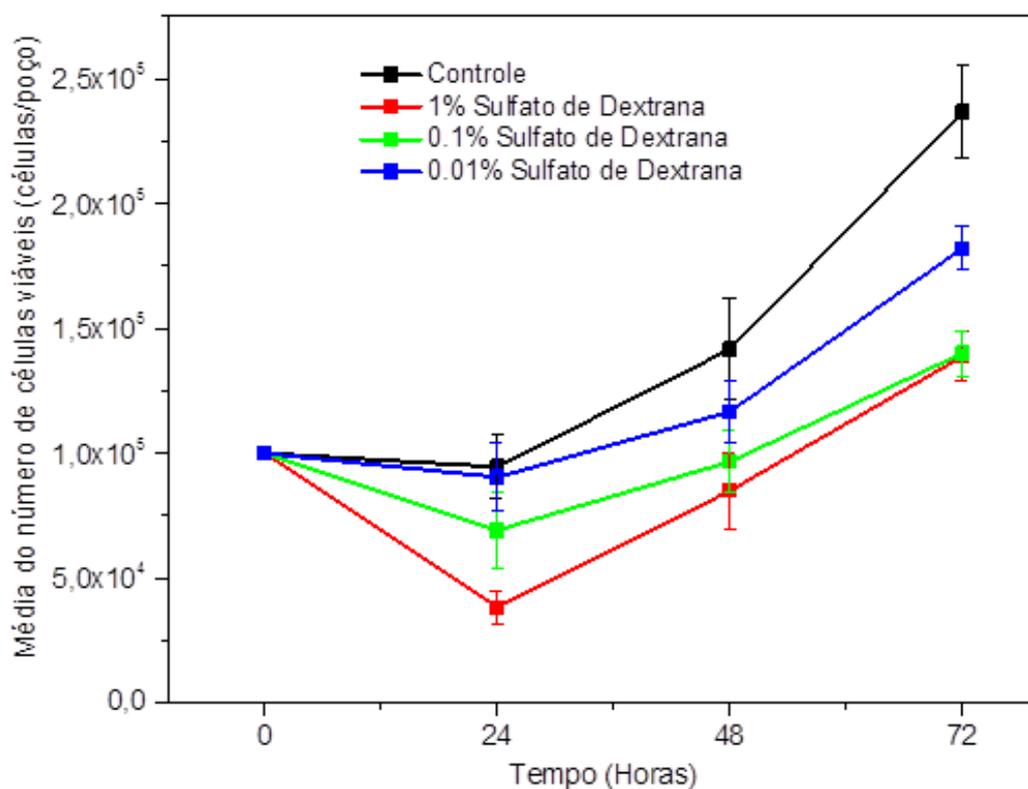


Figura 3.1 – Resultados do experimento 1 realizados em placas de poliestireno de 24 poços, sem microcarregadores. Foram testadas 3 concentrações diferentes de sulfato de dextrana. Inóculo de 1×10^5 células/mL. O número de células foi determinado pela contagem em hemacitômetro. Os valores apresentados são a média e desvio padrão obtido da utilização da amostragem de 3 poços por amostragem.

3.4 Experimento 2

Este experimento foi realizado como controle das condições iniciais da linhagem hMSC-TERT em cultivos em frasco spinner. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.2. Esta mostra o crescimento celular e os demais parâmetros avaliados durante 264 horas de cultivo. Os dados de crescimento são mostrados em escala Log 10 para evidenciar a fase exponencial.

Após o período de adesão (8 horas) foi observada uma fase exponencial (delimitada pela barra horizontal, e as setas pretas), apresentando uma velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}) de $0,014 \text{ h}^{-1}$, que corresponde a um tempo de duplicação de 49,51 horas. O crescimento foi contínuo até as 192 horas atingindo um valor máximo de $6,91 \times 10^7$ células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $1,34 \times 10^8$ com a correção do FD; o que representa um fator de expansão de 11 e 20 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado.

Na Figura 3.2(D) se apresentam os valores em número de células aderidas nos microcarregadores, sem a correção do fator de diluição (verde) e com fator de diluição (laranja). Optou-se por apresentar os valores corrigidos para ilustrar o valor que poderia se obter sem a retirada diária de meio para o monitoramento do cultivo, já que a retirada de amostra é significativa ao longo do tempo nos volumes trabalhados. Este fator de diluição (FD) refere-se a estimativa no caso das amostras de 2 mL contendo células e microcarregadores não fossem retiradas. A apresentação dos valores com FD são importantes para evitar a sub-estimação do número de células em cultivos em grande escala, já que para esses cultivos de volumes consideráveis ($> 5L$) as amostragens diárias não seriam significativas; estes valores são importantes também nos cultivos realizados para a terapia celular, já que nessas condições não seriam retiradas amostras diárias (principalmente para evitar riscos de contaminação).

O experimento apresentou uma fase de crescimento exponencial das 24 as 192 horas. Após este período observou-se uma redução no número de células quantificadas, e este declínio pode ser explicado pela formação de grandes aglomerados de microcarregadores que chegaram a uma média de $746 \mu m$ nas 192 horas de cultivo.

Na Figura 3.2(B) são apresentados os diâmetros médios de agregados de microcarregadores os pontos em rosa consideram todos os microcarregadores encontrados nas amostras analisadas, os valores em azul representam os diâmetros médios de agregados de microcarregadores acima de $400 \mu m$. Esses valores representam agregados de pelo menos dois microcarregadores, já que o valor máximo do diâmetro de um único microcarregador encontrado foi de $390 \mu m$. Mediante esta comparação, obtemos um valor mais representativo das médias de aglomerados ao excluir valores que tem em conta um único microcarregador.

Neste experimento observa-se que a partir das 144 horas os valores entre o antes e o depois das trocas de meios ficaram mais distantes, o que pode ser explicado pela presença de aglomerados que deixam menos homogêneas as amostragens já que um único aglomerado pode significar uma diferença muito grande entre as amostras. Além disso, estes aglomerados impedem a entrada do reagente do MTT, o que pode subestimar a quantificação das células que se encontram mais internamente nos grandes aglomerados.

Este fato aponta que a mesma dificuldade que o reagente do MTT tem ao entrar em contato com as camadas mais internas das células dos grandes aglomerados, também é encontrada pelos nutrientes e gases, o que poderia explicar a morte celular após a formação dos grandes aglomerados.

Alguns autores atribuíram o fato da formação destes aglomerados ao grande potencial de proliferação característico das células tronco e a capacidade de crescimento em multicamadas. (FRAUENSCHUH et al., 2007) (WEBER et al., 2007).

A Figura 3.2(D), também mostra os valores da concentração de células em suspensão

esses valores são baixos e relativamente constantes ao longo do cultivo, esse fato corrobora que o microcarregador Cultispher-S, e o protocolo adotados durante o período de 8 horas após o inóculo foi eficiente para garantir uma boa fase de adesão.

A Figura 3.2(A), mostra os valores de pH do experimento 2, observou-se a dificuldade de manter o pH na faixa ótima para este tipo de células (7,2-7,4) assim foram reportados valores mínimos de 6,7 às 120 e 168 horas de cultivo. Este fato é explicado pela quantidade de células e a consequente produção de ácido lático que acidifica o meio. Esta queda de pH melhorou pouco com as trocas de 50% do volume de meio diárias, já que após as 192 horas a queda de este parâmetro pode ter provocado o fim da fase exponencial e a posterior queda no crescimento celular.

A Figura 3.2(C), apresenta os valores em mM de nutrientes e metabólitos. Observa-se que a glicose atinge um valor mínimo de 4,1 mM às 168 horas, o que não afetou o crescimento celular. As maiores taxas de consumo específico de glicose foram observadas entre as 96 e 120 horas com valores de $4,43 \times 10^{-10}$ e $4,28 \times 10^{-10}$ (mmol Substrato/h*célula), respectivamente.

O consumo do aminoácido semiesencial arginina foi considerável neste cultivo, e atingiu valores mínimos as 120 horas (1,165 mM) porém não atingiu níveis próximos de zero nos quais outros autores já reportarem como uma variável importante de morte celular.(SANTOS, 2013).

Referente a produção de metabólitos, a amônia subproduto da glutamina atingiu valores inibitórios as 168 horas de cultivo (2,92 mM), assim a taxa máxima de produção deste metabólito se encontra entre as 168 e 192 horas (0,004 mmol/h) o que coincide com o número máximo de células.

É reportado na literatura que valores de 2,4 mM de amônia são inibitórios para CMM humanas (SCHOP et al., 2009), desta forma este fato junto com uma queda constante nos valores de pH são apontados como os mais determinantes para o fim da fase exponencial e a posterior queda no crescimento celular.

A Figura 3.3, apresenta imagens da microscopia ótica obtidas ao longo do cultivo onde se evidenciam a formação de aglomerados ao decorrer do tempo. Estes aglomerados são mais evidentes nas 192 horas de cultivo como mostra a Figura 3.3(i),(j).

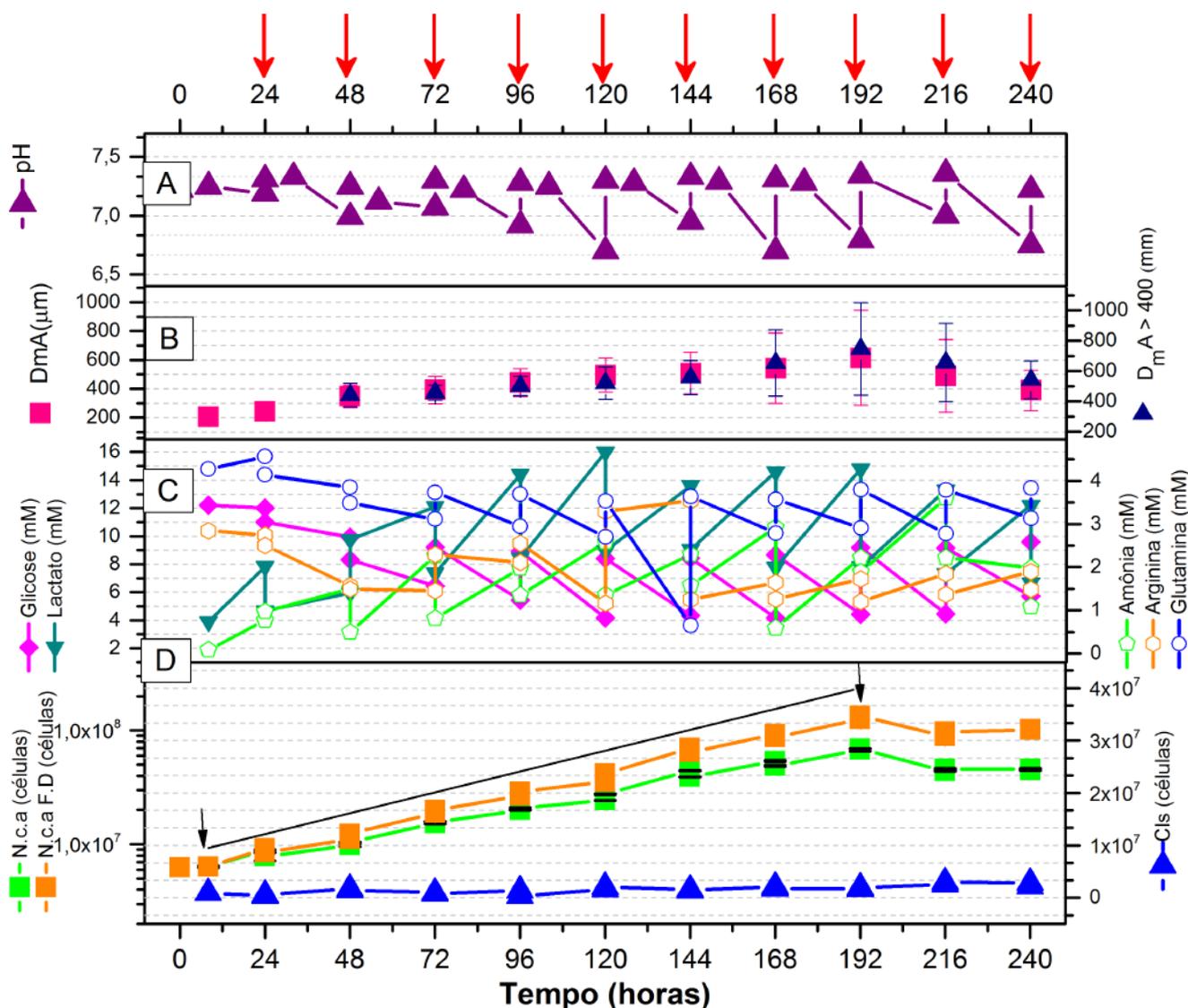


Figura 3.2 – Resultados obtidos no Experimento 2 (primeiro controle) com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner. com inóculo inicial de 1.25×10^5 células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. (A) Valores de pH obtidos. As setas vermelhas acima do gráfico na escala de tempo em horas representam as trocas de 50% de meio. (B) Resultados dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S®, os valores em rosa consideram todos os elementos da amostra, os valores em azul consideram os elementos acima de $400 \mu\text{m}$ (C) Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (amônia e lactato). (D) Número de células aderidas durante o cultivo. Os valores em laranja representam o número de células aderidas tendo em conta o fator de diluição (FD); os valores em verde representam os valores sem a correção do FD. Os valores em azul representam às células livres na suspensão. As setas pretas junto com a linha inclinada delimitam o início e o fim da fase exponencial, fase na qual será feito o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}).

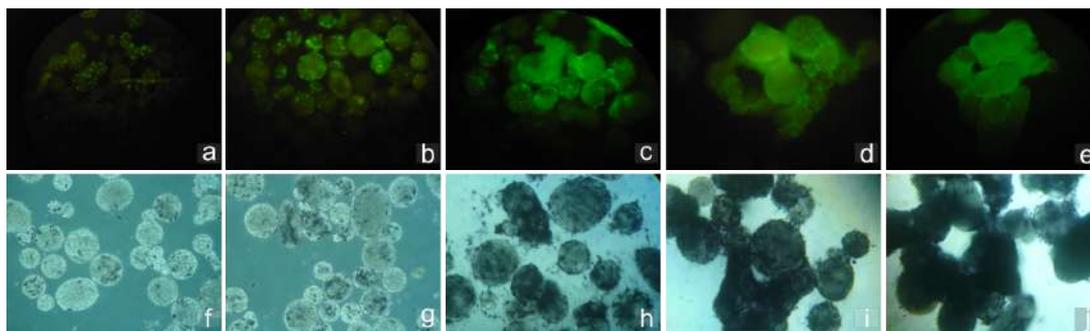


Figura 3.3 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 2. O tempo de cultivo em (a) e (f) foi de 8 horas, em (b) e (g) de 48 horas, em (c) e (h) de 144 horas, em (d),(e),(i),(j) de 192 horas. Nas imagens (a) à (e), as células ativas expressam GFP, e são evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens (f) à (j) as células viáveis correspondem aos pontos escuros que resultam da aplicação do corante MTT. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

3.5 Experimento 3

O experimento 3 foi realizado em condições experimentais similares ao experimento 2, com a única diferença da adição de 0,05% SD após as 24 horas de cultivo. Os resultados estão representados nas Figuras 3.5 e 3.4.

A Figura 3.5(D) apresenta o número de células obtido durante o cultivo até às 144 horas. Após a fase de adesão observou-se um ligeiro aumento no crescimento celular porém não foi o esperado para este experimento, assim o valor máximo de células obtido foi de $1,89 \times 10^7$ células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $3,12 \times 10^7$ com a correção do FD; o que representa um fator de expansão de 3 e 5 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado.

A Figura 3.5(C) mostra que durante este experimento não ocorreu esgotamento de glicose, nem foi evidenciado valores de amônia inibitórios no cultivo celular. Um fato importante de ressaltar é que o consumo do aminoácido arginina foi importante durante o cultivo, mesmo com concentrações baixas de células. Neste cultivo não se realizou a suplementação do meio com arginina (3 mM), de tal forma que foi realizado só com a arginina presente na formulação original do meio α -MEM (0,498 mM) mesmo assim ao comparar com outros trabalhos realizados no LATECC (MENDONÇA, 2013) se esperava um crescimento maior. Observou-se que ao adicionar o SD após às 24 horas o consumo de arginina se duplicou passando de $4,50 \times 10^{-4}$ a $9,04 \times 10^{-4}$ (mmol/h). Este fato permite deduzir que ao metabolismo da célula mudou com a adição de SD.

Assim houve dúvida sobre qual era a causa principal que impediu o crescimento satisfatório das células se este foi causado pela concentração de SD de 0,05% inoculada após

as 24 horas ou pelo esgotamento da arginina. Assim, com o fim de eliminar a influência da falta de arginina nos cultivos, o experimento 3 foi repetido mas com a adição de arginina numa concentração final de 3 mM.

A Figura 3.5(A) mostra que os valores de pH atingiram valores baixos por volta de 6,9 a partir das 72 horas de cultivo.

Devido ao fato que, não foi registrado um crescimento satisfatório do cultivo, os valores dos aglomerados não foram altos e a maior parte correspondem a microcarregadores individuais como o observado na Figura 3.5(B). A Figura 3.4 apresentam as imagens de microscopia ótica onde são evidentes hegemonia dos microcarregadores individuais durante o decorrer do experimento.

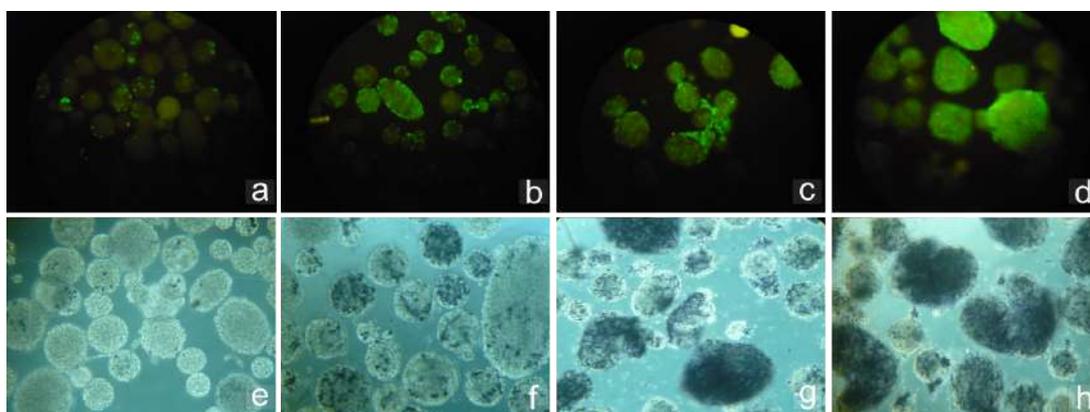


Figura 3.4 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 3. O tempo de cultivo em (a) e (e) foi de 8 horas, em (b) e (f) de 48 horas, em (c) e (g) de 96 horas, em (d),(h) de 144 horas. Nas imagens (a) à (d), as células ativas expressam GFP, e são evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens (e) à (h) as células viáveis consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

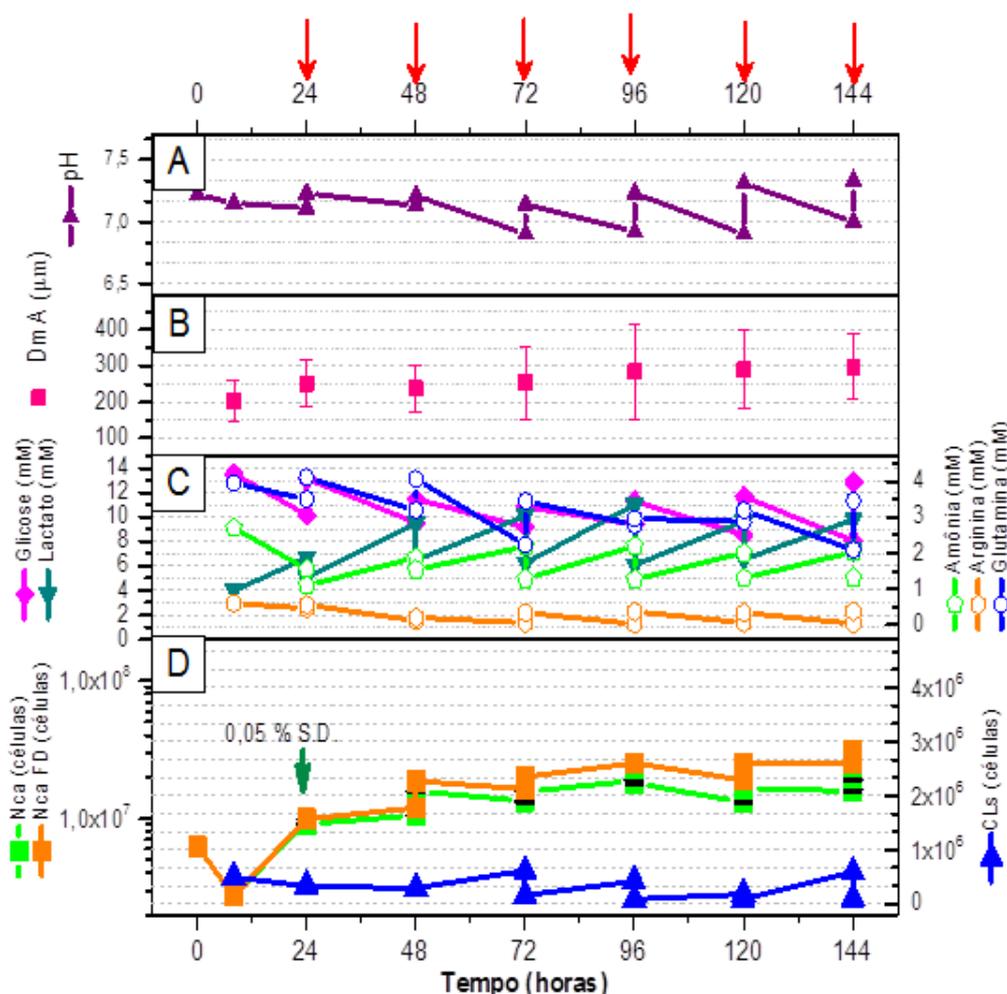


Figura 3.5 – Resultados obtidos no Experimento 3 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner. com inóculo inicial de 1.25×10^5 células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. (A) Valores de pH obtidos. As setas vermelhas acima do gráfico na escala de tempo em horas representam as trocas de 50% de meio. (B) Resultados dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S®, (C) Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (amônia e lactato). (D) Número de células aderidas durante o cultivo. Os valores em laranja representam o número de células aderidas tendo em conta o fator de diluição (FD); os valores em verde representam os valores sem a correção do FD. Os valores em azul representam às células livres na suspensão.

3.6 Experimento 4

Este experimento foi realizado em condições similares ao experimento 3 com a única diferença da suplementação do meio com arginina para atingir uma concentração

final de 3 mM. Os resultados estão representados nas Figuras 3.6 e 3.7.

Neste experimento o tempo de cultivo foi de 144 horas, o valor máximo de número de células foi reportado as 144 horas e correspondem aos valores de $2,07 \times 10^7$ células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $3,55 \times 10^7$ com a correção do FD; o que representa um fator de expansão de 3,3 e 5,7 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado.

Os valores de pH foram baixos a partir das 72 horas, mas foram controlados com as trocas de meio de cultura.

Observou-se uma diferença importante entre os diâmetros médios dos aglomerados quando se tem em conta só os valores acima de $400 \mu\text{m}$ (azul) e todos os microcarregadores presentes na amostra (rosa), assim às 144 horas se reportam valores de $341 \mu\text{m}$ para a amostra total e de $511 \mu\text{m}$ para microcarregadores acima de $400 \mu\text{m}$. Este demonstra que a maioria dos elementos presentes na amostra se encontram abaixo do diâmetro médio dos microcarregadores.

Com respeito á análises de nutrientes, percebe-se que a suplementação do meio com arginina permitiu que este aminoácido não alcançasse valores próximos à zero, o valor mínimo de 1,34 mM foi reportado logo às 24 horas. A glicose também obteve seu valor mínimo às 144 com 5,08 mM mas não chegou a alcançar valores que comprometessem o cultivo.

Referente aos metabólitos a produção de amônia foi baixa e o lactato alcançou seu valor máximo de 12,6 mM às 72 horas.

A análise dos resultados deste experimento com suplementação de arginina permite esclarecer que o efeito inibidor do crescimento visto no experimento anterior se deve a concentração de 0,05% de SD. Portanto, a adição de concentrações de SD tem que ser menor que este valor.

A Figura 3.7(h) confirma a ausência de grandes aglomerados, mostrando apenas que a melhoria no crescimento, embora baixa, se deve à proliferação das células dentro do mesmo microcarregador.

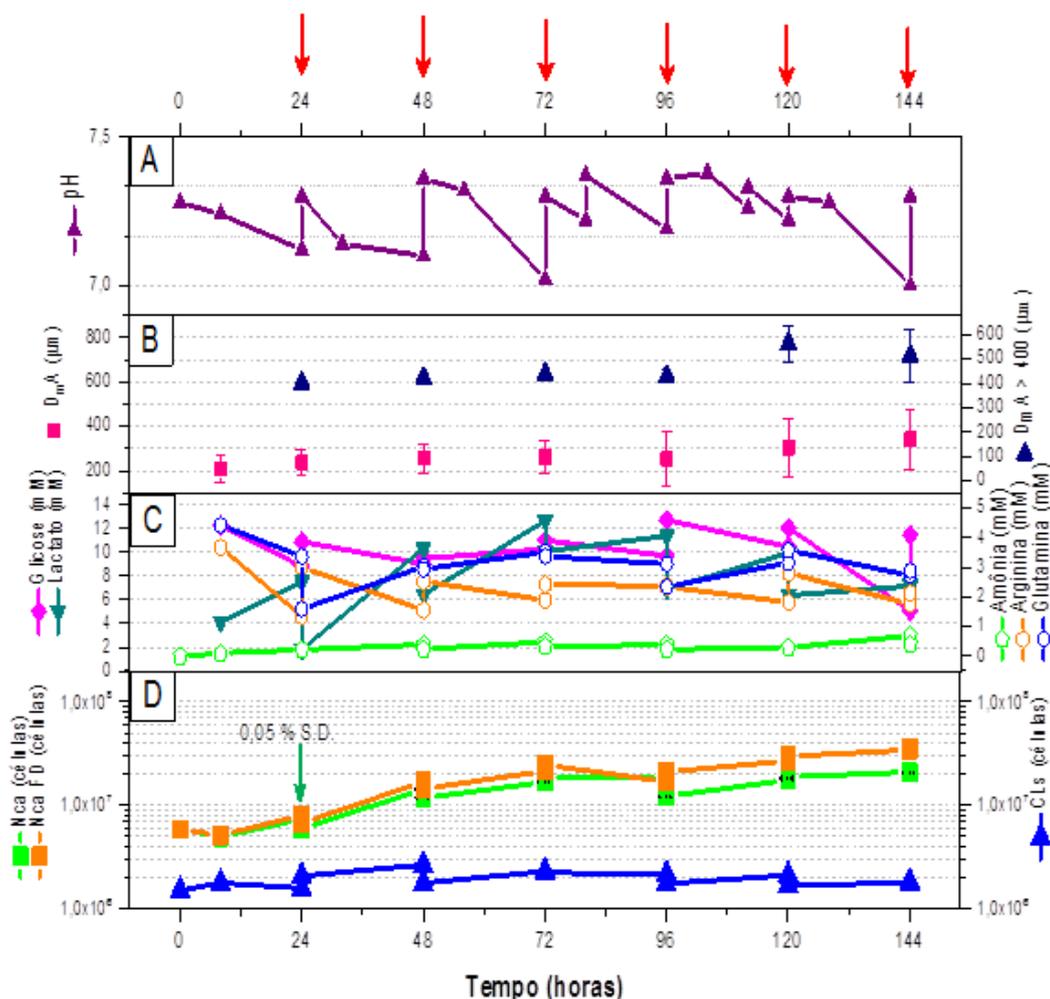


Figura 3.6 – Resultados obtidos no Experimento 4 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner. com inóculo inicial de 1.25×10^5 células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S®. (A) Valores de pH obtidos. As setas vermelhas acima do gráfico na escala de tempo em horas representam as trocas de 50% de meio. (B) Resultados dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S®, os valores em rosa consideram todos os elementos da amostra, os valores em azul consideram os elementos acima de $400 \mu\text{m}$ (C) Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (amônia e lactato).(D) Número de células aderidas durante o cultivo. Os valores em laranja representam o número de células aderidas tendo em conta o fator de diluição (FD); os valores em verde representam os valores sem a correção do FD. Os valores em azul representam ás células livres na suspensão.

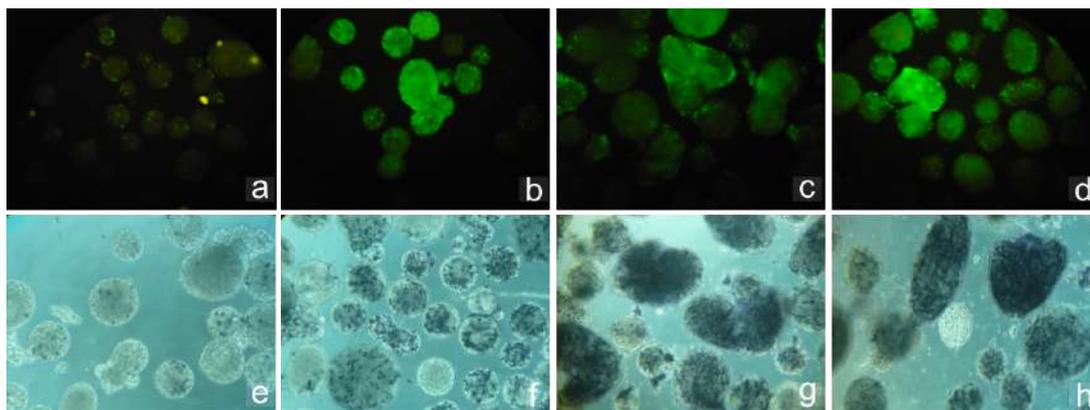


Figura 3.7 – O tempo de cultivo em (a) e (e) foi de 8 horas, em (b) e (f) de 48 horas, em (c) e (g) de 120 horas, em (d),(h) de 144 horas. Nas imagens (a) à (d), as células ativas expressam GFP, e são evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens (e) à (h) as células viáveis consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

3.7 Experimento 5

Realizou-se em condições similares ao experimento 2, a única modificação realizada foi a adição de SD na concentração de 0,01% 24 horas após o inóculo. Os resultados estão representados nas Figuras 3.9 e 3.8.

A Figura 3.9(D) mostra que, mesmo sem atingir valores de crescimento parecidos com o experimento controle, o uso desta concentração nos permite visualizar uma breve fase exponencial, esta foi delimitada entre as 24 e 96 horas e se obteve um μ_{max} de 0,018 (h^{-1}), o qual é semelhante a outras obtidas na literatura como a de 0,02 (h^{-1}), obtida por Schop e colaboradores (2009). E chega ser ainda superior ao 0,010 (h^{-1}) apresentadas por Santos (2013). Assim, este experimento obteve um valor máximo de $3,94 \times 10^7$ células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $5,73 \times 10^7$ com a correção do FD; o que representa um fator de expansão de 4,5 e 6,6 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado.

Assim esta melhora de quase o 20% no crescimento não pode ser mantida e se observou uma queda às 120 e 144 horas, o que foi acompanhado por quedas de pH consideráveis.

Em referência aos nutrientes, a glicose se manteve em níveis aceitáveis e não chegou a esgotar, já a arginina manteve uma taxa de consumo alta durante todo cultivo quando comparada com o consumo do experimento controle, assim se reportou um valor de consumo de $3,02 \times 10^{-3}$ (mmol/h) entre às 96 e 120 horas de cultivo, acompanhando os valores máximos de número de células. É importante ressaltar que, devido aos testes no experimento 3 observou-se que a taxa de consumo de arginina também se duplicou após a

adição do S.D. Se encontrarem valores de arginina próximos de zero às 120 e 144 horas, o que sugere que a depleção da arginina possa ter ocasionado o fim da fase exponencial. Foram alcançados com 144 horas valores de amônia de 2,27 mM, estes valores embora altos não atingem ao valores inibitórios reportados na literatura. Os valores de lactato foram de 14mM as 96 horas assim foi observada a maior taxa de produção deste metabólito entre as 72 e 96 horas com um valor de 0,018 (mmol/h).

Os diâmetros dos aglomerados às 96 horas apresentam um valor 415 μm e quando comparado com a quantidade parecidas em número células do controle (507 μm) representam uma redução de quase o 40% de tamanho dos aglomerados. Assim, podemos sugerir um efeito do SD na formação de aglomerados.

A Figura 3.8 apresenta imagens da microscopia ótica onde se observam a presença de aglomerados de até três microcarregadores.

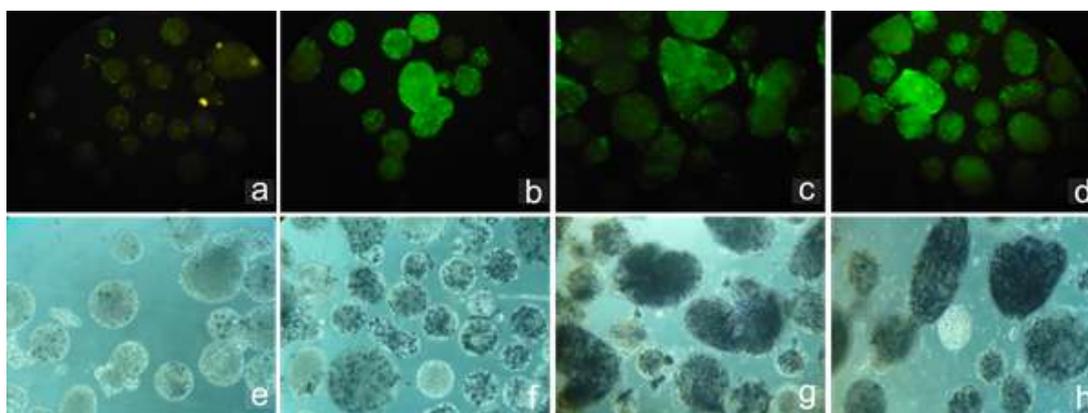


Figura 3.8 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 5. O tempo de cultivo em (a) e (e) foi de 8 horas, em (b) e (f) de 48 horas, em (c) e (g) de 96 horas, em (d),(h) de 144 horas. Nas imagens (a) à (d), as células ativas expressam GFP, e são evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens (e) à (h) as células viáveis consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. A magnificação foi de 100x para todas as imagens

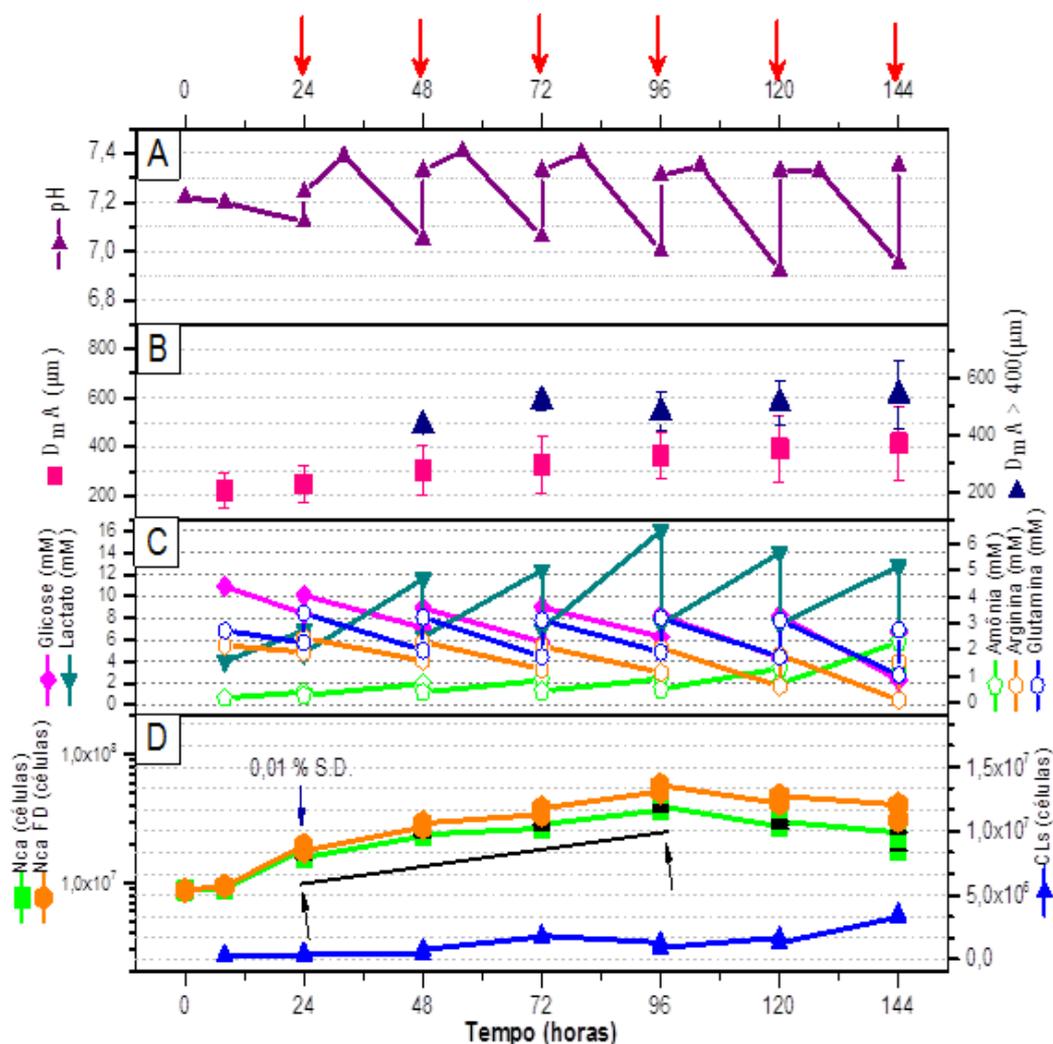


Figura 3.9 – Resultados obtidos no Experimento 5 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner. com inóculo inicial de 1.25×10^5 células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S®. Os cultivos foram realizados com meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino. (A) Valores de pH obtidos. As setas vermelhas acima do gráfico na escala de tempo em horas representam as trocas de 50% de meio. (B) Resultados dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S®, os valores em rosa consideram todos os elementos da amostra, os valores em azul consideram os elementos acima de $400 \mu\text{m}$ (C) Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (amônia e lactato). (D) Número de células aderidas durante o cultivo. Os valores em laranja representam o número de células aderidas tendo em conta o fator de diluição (F.D); os valores em verde representam os valores sem a correção do F.D. Os valores em azul representam às células livres na suspensão. As setas pretas junto com a linha inclinada delimitam o início e o fim da fase exponencial, fase na qual será feito o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}).

3.8 Experimento 6

Este experimento foi realizado como o intuito de verificar se a linhagem hMSC-TERT tinha se modificado, já que o período de tempo transcorrido entre a realização do primeiro e segundo controle foi de mais de 6 meses; este experimento foi realizado nas mesmas condições que o experimento 2. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 3.11 e 3.10.

O crescimento foi contínuo até as 168 horas atingindo um valor máximo de $8,06 \times 10^7$ células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $1,44 \times 10^8$ com a correção do FD; o que representa um fator de expansão de 13 e 23 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado.

Após as 168 horas observou-se uma ligeira queda no número de células, a qual ficou evidente nas 216 e 240 horas. Desta forma este experimento permitiu a observação de uma curva de crescimento característica de células animais, pois foram estabelecidas com relativa facilidade as fases lag, fase de adaptação ao novo ambiente, (as primeiras 24 horas), a fase exponencial, período no qual as células se encontram bem adaptadas no seu melhor estado fisiológico (das 24 as 168 horas), uma breve fase estacionária, onde os nutrientes a pesar das trocas de meios começam a ficar escassos e também o acúmulo de metabólitos é determinante (das 168 a 192 horas). É uma fase de morte onde a maioria de células morre, embora, algumas continuem dividindo-se (das 192 a 216 horas). Neste tipo de cultivo é possível observar que, devido a troca de meio com a consequente renovação dos nutrientes, uma tentativa de recuperação das células acontece entre as 216 e 264 horas, onde o experimento é encerrado. A análise da fase exponencial permitiu o cálculo do μ_{max} obtendo-se um valor de $0,021 \text{ h}^{-1}$ o maior valor de μ_{max} alcançado neste trabalho.

Na Figura 3.11(A) se apresentam os dados do pH, este alcançou valores mínimos às 168 e 192 horas (6,79 e 6,78 respectivamente). Os valores baixos de pH reportados podem ter influenciado no fim da fase exponencial do cultivo.

A formação de grandes aglomerados acompanha o crescimento celular assim, as maiores médias de aglomerados são obtidas nos períodos de maior crescimento celular (entre as 168 e as 192 horas), é importante ressaltar que neste período a diferença entre os diâmetros dos aglomerados totais e acima de $400 \mu\text{m}$ não é significativa. Este fato explica que, nas amostras analisadas quase todos os elementos se encontrarem na forma de agregados (2 ou 3 microcarregadores juntos) ou formando grandes aglomerados, resultantes da união destes agregados. A formação destes grandes aglomerados é necessária para alcançar número de células máximos, após um curto período de tempo resultam em ambientes prejudiciais ao cultivo, pois podem provocar o aumento da morte celular ao impedir a troca de nutrientes e gases, observado nas imagens da microscopia ótica da Figura 3.10.

Durante este experimento a glicose não foi esgotada e o valor mínimo obtido foi de 3,6 mM às 264 horas. Referente a concentração da arginina o valor mínimo apresentado é de 1,2 mM, verificando que após a suplementação do meio com este aminoácido se evitam valores próximos à zero que podem ocasionar o fim da fase exponencial. O lactato apresentou seus valores máximos às 192 e 264 horas de (13,7 e 15,7 mM) mas não chegou a níveis inibitórios (28 mM). Um fator que apontamos como o mais determinante no declínio do crescimento celular é o acúmulo do metabólito amônia, que apresenta valores de acima do nível inibitório (2,4 mM) nas 144 horas (4,16 mM). Este primeiro valor embora represente quase o dobro do valor inibitório pode ter sido minimizado pela troca de meio razão pela qual as células mantiveram o crescimento até às 168 horas. No entanto, valores acima do nível inibitório constantes como os apresentados nas 168 horas (3,76 mM), 192 horas (3,92 mM) e 216 horas (3,48 mM), são apontados como a principal causa na diminuição do crescimento celular.

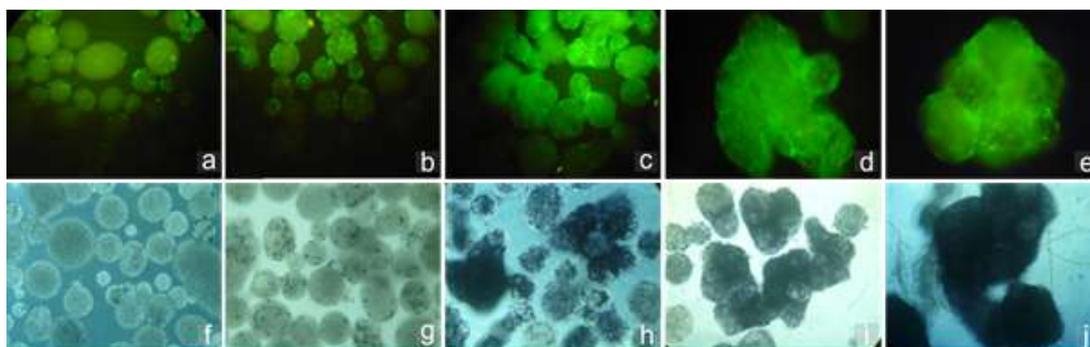


Figura 3.10 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 6. O tempo de cultivo em (a) e (f) foi de 8 horas, em (b) e (g) de 48 horas, em (c) e (h) de 120 horas, em (d),(e),(i),(j) de 168 horas. Nas imagens (a) à (e), as células ativas expressam GFP, e são evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens (f) à (j) as células viáveis consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

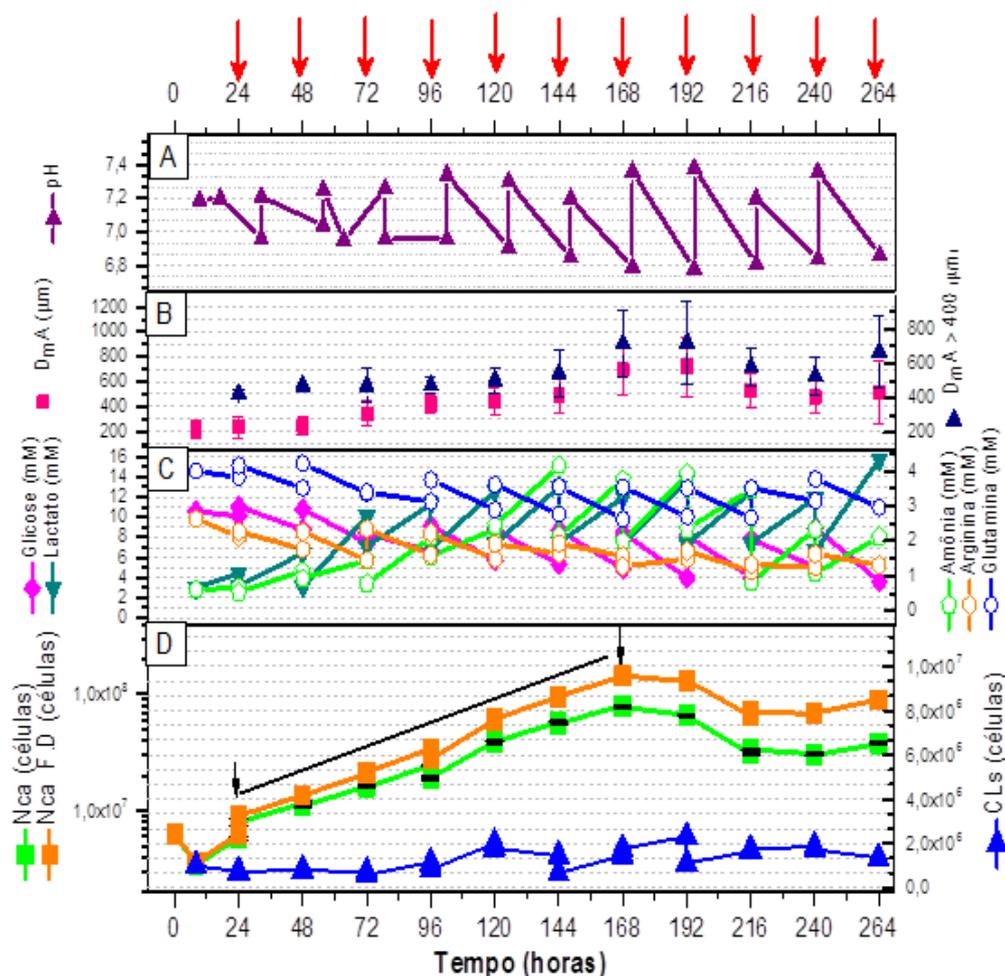


Figura 3.11 – Resultados obtidos no Experimento 6 (segundo controle) com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner. com inóculo inicial de 1.25×10^5 células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S®. (A) Valores de pH obtidos. As setas vermelhas acima do gráfico na escala de tempo em horas representam as trocas de 50% de meio. (B) Resultados dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S®, os valores em rosa consideram todos os elementos da amostra, os valores em azul consideram os elementos acima de $400 \mu\text{m}$ (C) Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (amônia e lactato). (D) Número de células aderidas durante o cultivo. Os valores em laranja representam o número de células aderidas tendo em conta o fator de diluição (FD); os valores em verde representam os valores sem a correção do FD. Os valores em azul representam às células livres na suspensão. As setas pretas junto com a linha inclinada delimitam o início e o fim da fase exponencial, fase na qual será feito o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}).

3.9 Experimento 7

Este experimento foi realizado com o intuito de reproduzir as condições do experimento 5, e comprovar o efeito da concentração de 0,01% S.D. nos cultivos em frasco spinner. As Figuras 3.13 e 3.12 mostram os resultados obtidos neste experimento.

De forma geral o experimento se desenvolveu satisfatoriamente até as 168 horas de cultivo, onde se reconhece uma fase exponencial das 48 as 168 horas de cultivo, assim a velocidade específica de crescimento (μ_{max}) foi de $0,016 h^{-1}$. Se registrou um valor máximo de $4,83 \times 10^7$ células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $8,3 \times 10^7$ com a correção do FD; o que representa um fator de expansão de 8 e 13 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado.

O valor mínimo de pH se registrou as 192 horas (6,74) e o máximo as 168 e 216 horas (7,4). Os nutrientes glicose e glutamina apresentam valores mínimos de 1,92 mM e 2,3 mM o que demonstrou que foram consumidos mas não esgotaram. Já arginina atingiu valores próximos à zero a partir das 168 horas (0,023 mM), este valor baixo sugere que, ao esgotar a arginina deve ter ocorrido a morte celular. Os valores do metabólito amônia alcançaram níveis inibitórios a partir das 96 h (3,92 mM), contudo o crescimento celular foi mantido até as 168 h, onde foram atingidos valores duas vezes maior que o valor inibitório (4,81 mM) o que sem dúvida foi fator fundamental na morte celular observada entre as 168 e 192 horas de cultivo.

Neste experimento se observa a formação de aglomerados com uma media de entre 539 e 581 μ_m , que permitiram que o número de células máximo atingido se duplicasse quando comparado com o experimento 5. Porém, não foi possível determinar de maneira precisa o efeito do SD nos grandes aglomerados acima de 700 μ_m , pois o acúmulo excessivo de amônia interrompeu o crescimento celular.

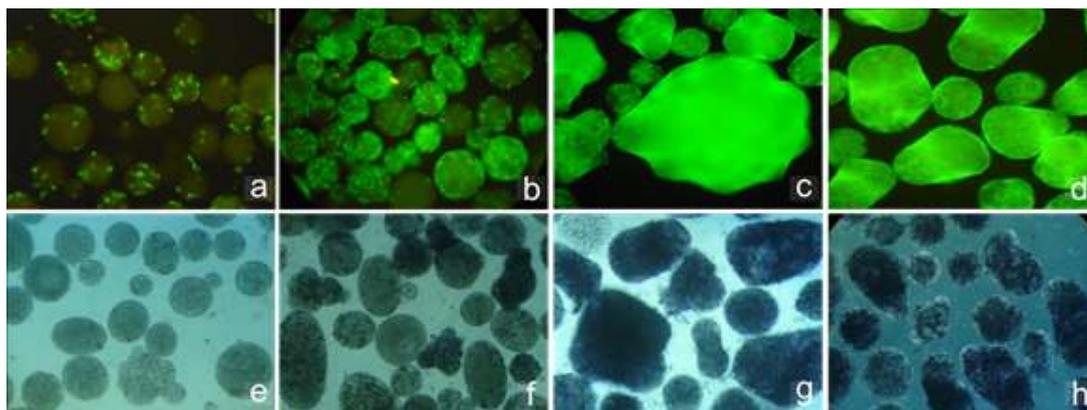


Figura 3.12 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher - S no decorrer do experimento 7. O tempo de cultivo em (a) e (e) foi de 8 horas, em (b) e (f) de 48 horas, em (c) e (g) de 144 horas, em (d),(h) de 216 horas. Nas imagens (a) à (d), as células ativas expressam GFP, e são evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens (e) à (h) as células viáveis consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

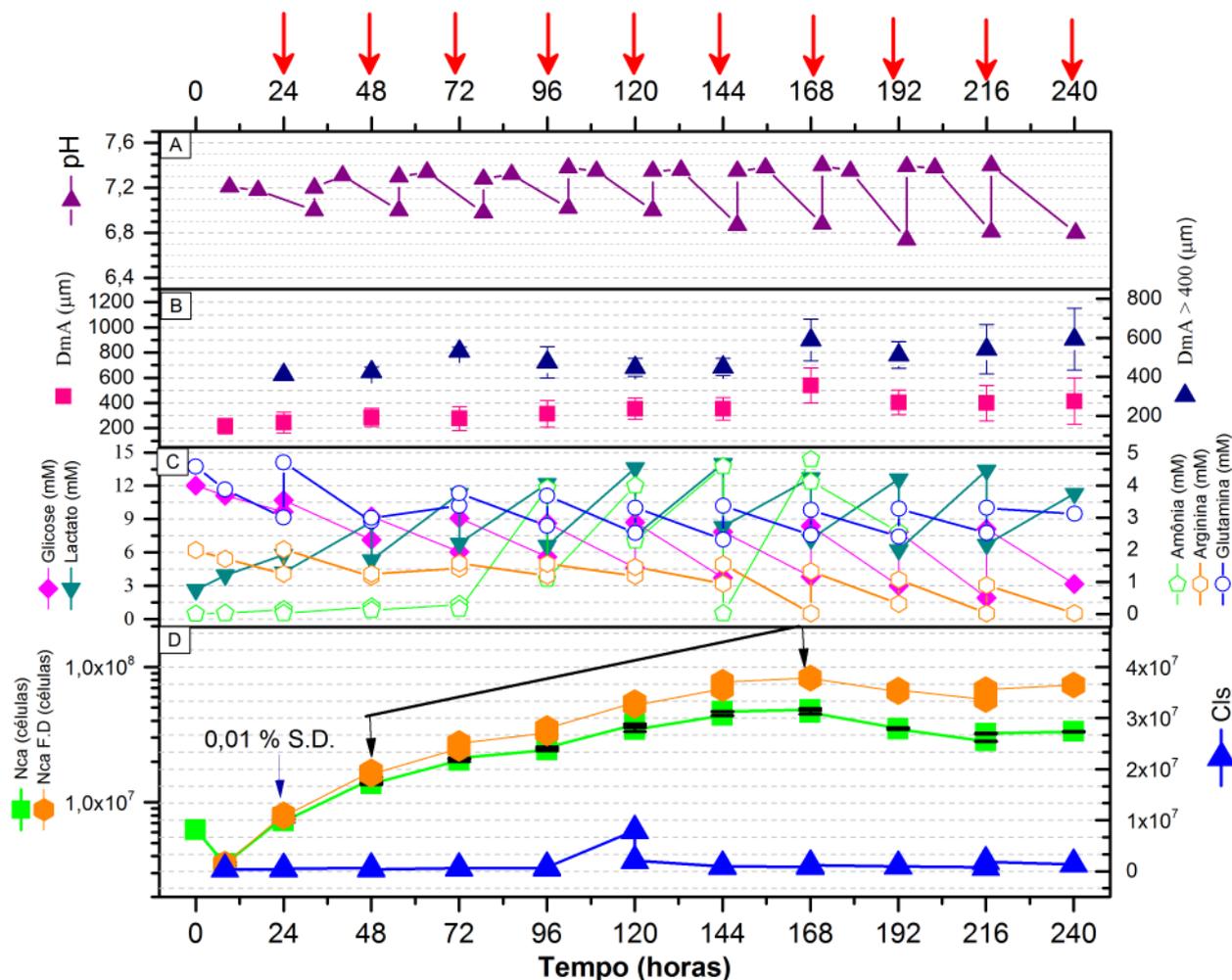


Figura 3.13 – Resultados obtidos no Experimento 7 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner com inóculo inicial de 1.25×10^5 células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S®. (A) Valores de pH obtidos. As setas vermelhas acima do gráfico na escala de tempo em horas representam as trocas de 50% de meio. (B) Resultados dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S®, os valores em rosa consideram todos os elementos da amostra, os valores em azul consideram os elementos acima de $400 \mu\text{m}$ (C) Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (amônia e lactato). (D) Número de células aderidas durante o cultivo. Os valores em laranja representam o número de células aderidas tendo em conta o fator de diluição (FD); os valores em verde representam os valores sem a correção do FD. Os valores em azul representam às células livres na suspensão. As setas pretas junto com a linha inclinada delimitam o início e o fim da fase exponencial, fase na qual será feito o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}).

3.10 Experimento 8

Com a finalidade de comprovar a efeito do S.D. na modulação da formação de aglomerados, comparada com a de um produto comercial foi escolhido o produto anti-clumping (GIBCO,USA).

Este aditivo é utilizado tradicionalmente para resolver o problema da agregação de em cultivos de células independentes de ancoragem, e já foi reportado se uso em cultivos de célula HEK293 para a produção de adenovírus (LOPEZ, 2010).

Durante a realização deste trabalho não foram encontrados relatos na literatura do uso do anti-clumping em cultivos de células aderentes. Como consequência da falta de informações sobre o uso desse aditivo no cultivo de células tronco foi realizado um experimento exploratório em placas de poços para avaliar diferentes concentrações do aditivo na ação antiaglomerante e seu efeito no crescimento celular.

A Figura 3.14 apresenta os resultados obtidos em três dias de cultivo com três concentrações diferentes de Anti-clumping. Após às 24 horas observou-se uma queda no número de células nas diluições de $1/10^4$ e $1/10^3$ (v/v) o que pode indicar um efeito negativo nos processos de adesão celular. Já a diluição de $(1/10^4)$ (v/v) manteve o número de células do inóculo, assim deduzimos que esta concentração não tem um efeito tão agressivo sob a adesão, no decorrer do cultivo observou-se que a diluição $(1/10^4)$ (v/v) alcançou valores de número total de células muito próximos ao controle. Em relação ao grupo controle o mesmo cresceu com normalidade.

Como se pode notar na Figura 3.14 4, depois das 48 horas o crescimento celular na concentração $(1/10^4)$ é maior que o do controle, possivelmente, devido ao efeito inibitório na formação de ligações célula-célula e, portanto, da agregação celular.

Assim foi determinado o uso da diluição $(1/10^4)$ nos cultivos em frasco spinner. Desta forma este aditivo também poderá ser adicionado continuamente após as 24 horas do inóculo sem ultrapassar essa concentração.

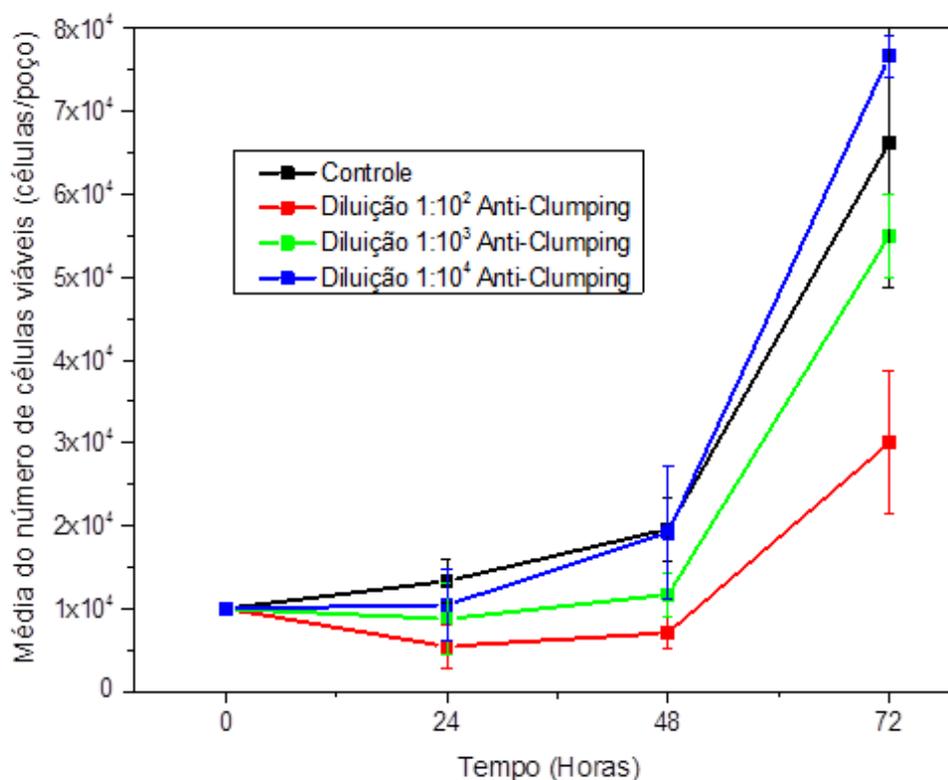


Figura 3.14 – Resultados do experimento 8 realizados em placas de poliestireno de 24 poços, sem microcarregadores. No cultivo utilizou-se meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, foram testadas 3 concentrações diferentes de Anti-clumping, para definir o valor utilizado em experimentos em spinner. Inoculo de 1×10^4 células/mL em incubadora com 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C . Os valores representam a média do número de células viáveis por poço ao longo de três dias de cultivo. Os valores representam a média do número de células viáveis por poço ao longo de três dias de cultivo.

3.11 Experimento 9

Este experimento foi realizado em condições semelhantes ao experimento dois, com a única diferença que foi adicionado o produto anticlumping em uma diluição ($1/10^4$) (v/v) após as 24 horas de cultivo. Os resultados se apresentam na Figura 3.16 e a Figura 3.15. Como pode ser notado os valores de células aderidas aumentaram no decorrer do tempo e foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}) entre as 48 e 192 horas, assim se obteve um valor de $0,010 h^{-1}$.

Contudo o valor máximo do número de células aderidas foi de $3,98 \times 10^7$ células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $6,83 \times 10^7$ com a correção do FD; o que representa um fator de expansão de 6 e 11 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado. Embora o crescimento não tenha sido o esperado, comprovou-se que é possível o cultivo de CMM em presença deste produto.

Uma possível explicação para o fim da fase exponencial e a posterior morte celular são as oscilações extremas de pH.

O valor máximo do lactato foi atingido às 120 horas (12,9 mM), a Arginina apresentou um valor mínimo de 1,48 mM às 96 horas. A amônia não foi quantificada.

Na Figura 3.15 é evidente como os microcarregadores mesmo com células não formam agregados ao longo do cultivo. Em 72 horas, por exemplo, se atingiu um pH muito baixo de aproximadamente 6,8. A partir deste instante até 192 horas a inclinação da curva de células em função do tempo ficou constante, podendo ser interpretado como um crescimento exponencial com valor menor que a do intervalo de 8 à 48 horas. Por volta de 192 horas o pH subiu para um valor muito alto, aproximadamente 7,5, condição que pode ter prejudicado as células, provocando a queda de crescimento observada no gráfico D.

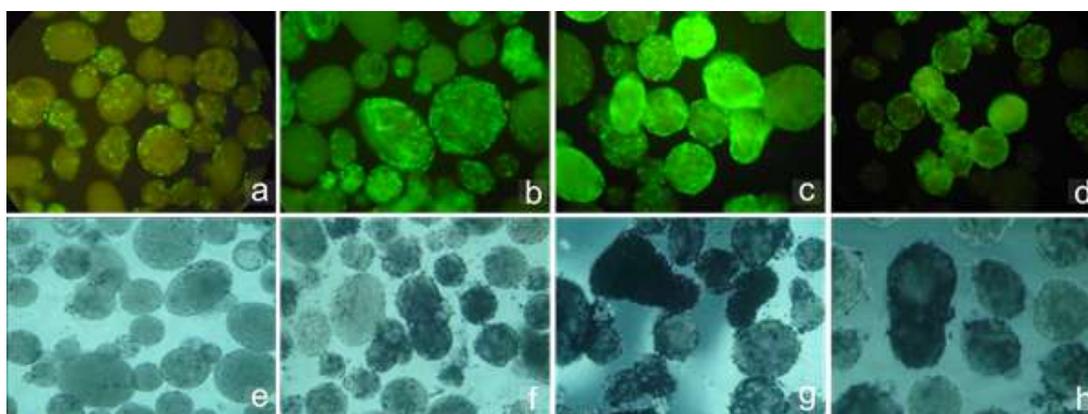


Figura 3.15 – Imagens da microscopia dos microcarregadores Cultispher-S® no decorrer do experimento 9. O tempo de cultivo em (a) e (e) foi de 8 horas, em (b) e (f) de 48 horas, em (c) e (g) de 168 horas, em (d),(h) de 192 horas. Nas imagens (a) à (d), as células ativas expressam GFP, e são evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens (e) à (h) as células viáveis consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

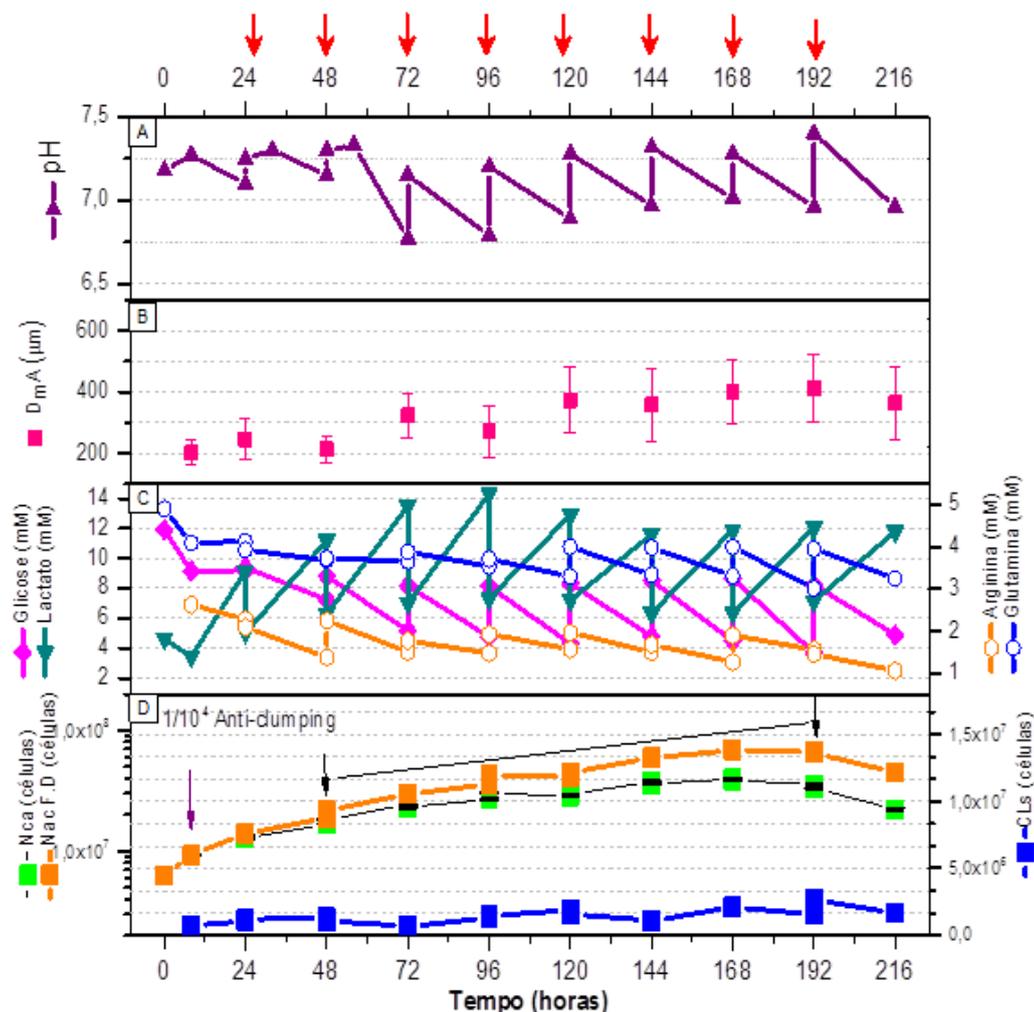


Figura 3.16 – Resultados obtidos no Experimento 9 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner. com inóculo inicial de 1.25×10^5 células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. (A) Valores de pH obtidos. As setas vermelhas acima do gráfico na escala de tempo em horas representam as trocas de 50% de meio. (B) Resultados dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S[®], os valores em rosa consideram todos os elementos da amostra, os valores em azul consideram os elementos acima de $400 \mu\text{m}$ (C) Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (amônia e lactato). (D) Número de células aderidas durante o cultivo. Os valores em laranja representam o número de células aderidas tendo em conta o fator de diluição (FD); os valores em verde representam os valores sem a correção do FD. Os valores em azul representam às células livres na suspensão. As setas pretas junto com a linha inclinada delimitam o início e o fim da fase exponencial, fase na qual será feito o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}).

3.12 Recuperação celular pós-cultivo

Já que um dos objetivos principais das pesquisas com CMM é seu uso em terapia celular, devem ser avaliadas as possibilidades de recuperação da maior quantidade de células com alta viabilidade e funcionalidade. Desta forma, após os cultivos em frasco spinner, as células foram dissociadas dos microcarregadores utilizando a enzima Tryple® conforme descrito anteriormente. Na Figura 3.17 serão comparados os valores obtidos com o método do MTT e os valores obtidos da contagem da densidade celular após a tripsinização de todo o volume de cultivo. Assim foi observado que o uso de aditivos melhorou as porcentagens de recuperação, esta melhora pode ser explicada pelo fato de modular a formação de aglomerados permitindo uma ação mais eficiente da enzima Tryple 10X. No trabalho de Mendonça (2013) foi reportado que quando os aglomerados de microcarregadores são maiores precisa-se de mais tempo para a dissolução dos mesmos ocasionando a morte das células da superfície dos aglomerados por ação da Tryple 10X. Desta forma o uso de aditivos também ofereceria uma vantagem na recuperação ao impedir a formação destes grandes aglomerados.

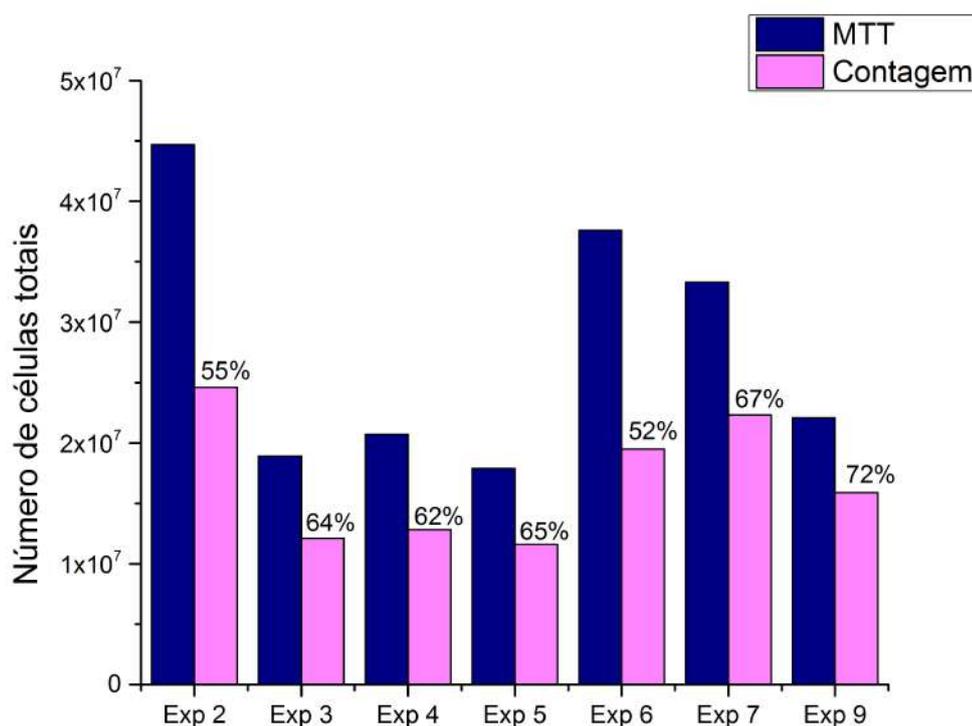


Figura 3.17 – Resultados das células recuperadas durante os cultivos em frasco spinner. Os valores representam o número de células viáveis que foram desaderidas dos microcarregadores Cultispher-S por meio da enzima Tryple 10X comparados com os valores obtidos pelo método do MTT.

3.13 Avaliação imunofenotípica e funcional das CMM pós cultivo

3.13.1 Imunofenotipagem

A expressão antigênica das proteínas de superfície das CMM foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados encontrados demonstram que as células cultivadas em frasco spinner e recuperadas após o cultivo em microcarregador, possuem características imunofenotípicas compatíveis com as das CMM.

A Figura 3.18 apresenta os resultados dos principais marcadores imunofenotípicos das CMM pre e pós cultivo em frasco spinner, do experimento 7 (suplementado com 0,01% SD)

Desta forma, se confirma baixa expressão dos marcadores de células hematopoiéticas (CD14, CD45, CD34) e do antígeno leucocitário humano (HLA-DR), também se comprueba a expressão significativa dos antígenos CD90, CD73, CD105, CD49 (HORWITZ et al., 2005).

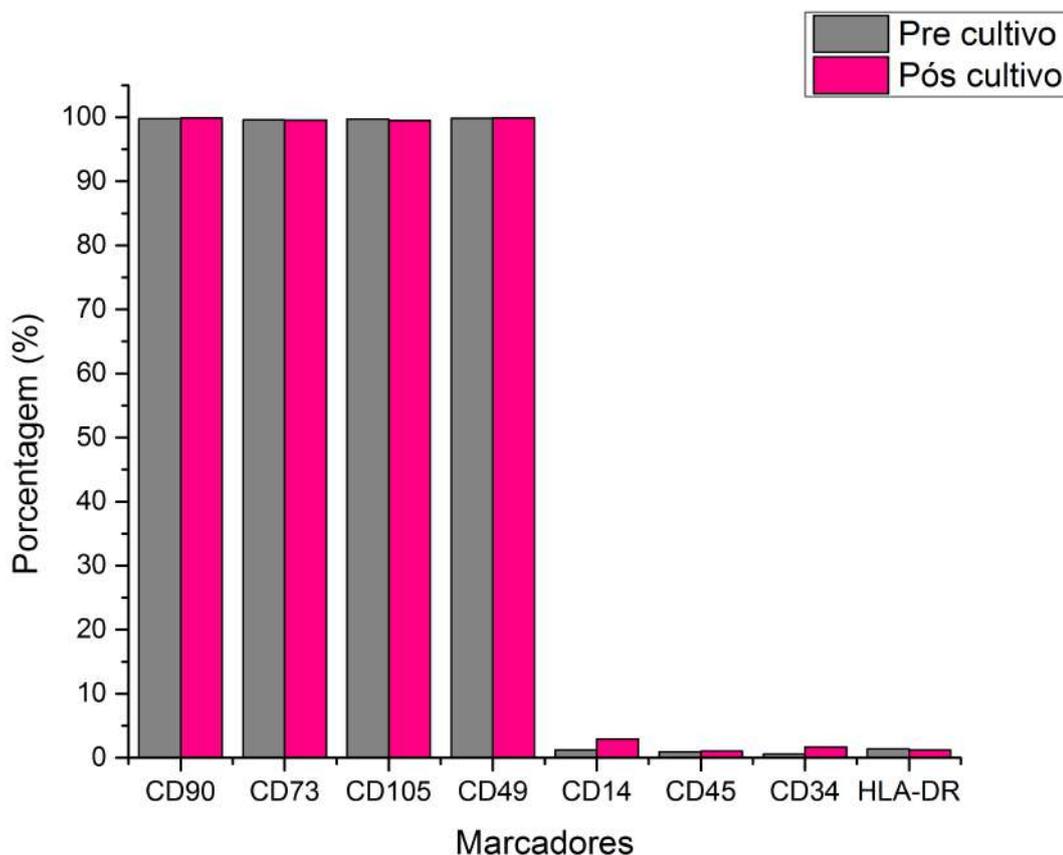
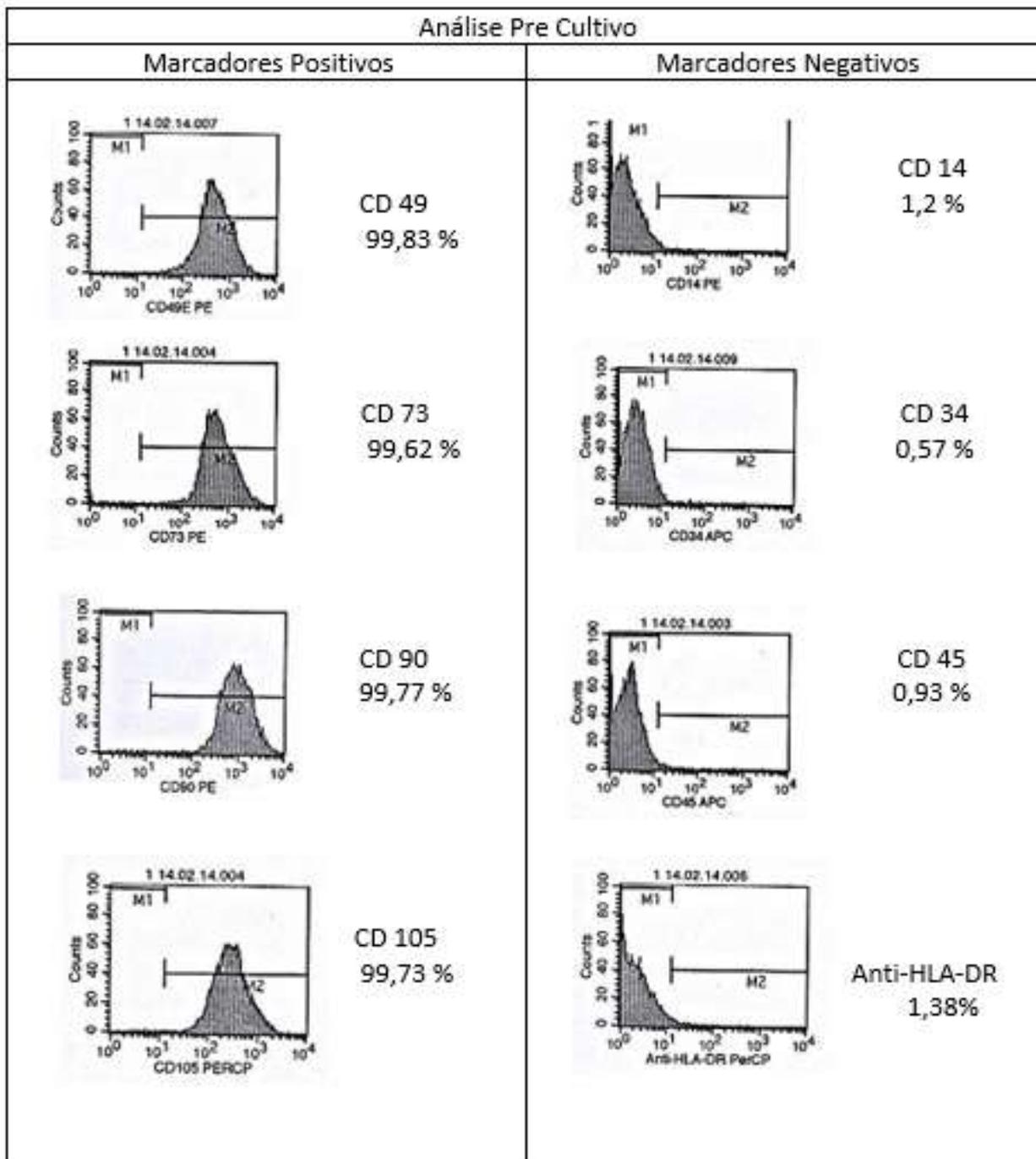


Figura 3.18 – Principais marcadores imunofenotípicos das CMM pré e pós cultivo no experimento 7. CMM cultivadas em frasco spinner com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher- S®, suplementado com 0,01% de SD após as 24 horas do inóculo.

Na Figura 3.19 se apresentam os resultados detalhados das análises de citometria de fluxo que mostraram que as características fenotípicas das CMM utilizadas no experimento 7 (suplementado com 0,01% SD) foram conservadas.



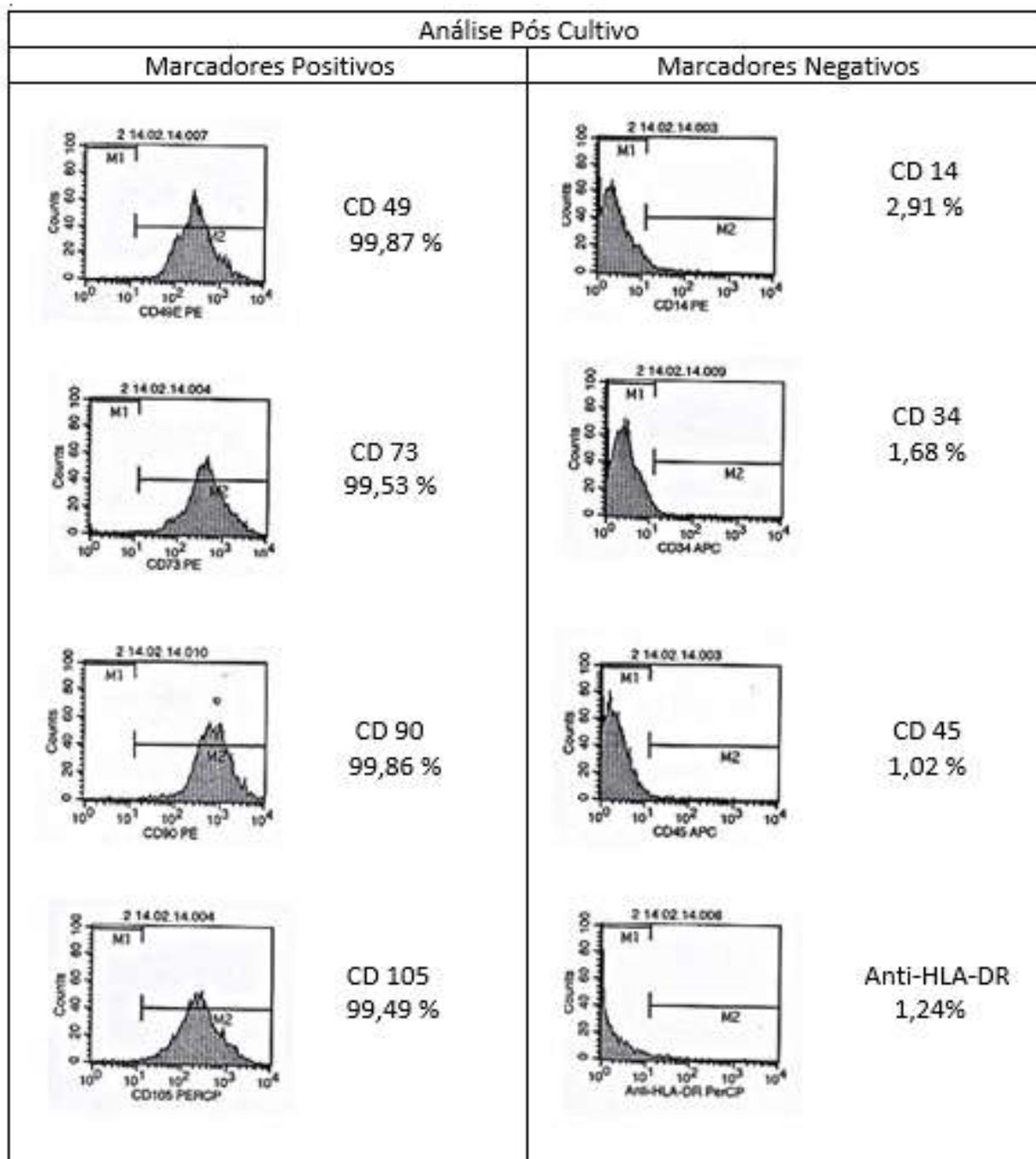


Figura 3.19 – Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT pre e pós o cultivo em spinner no experimento 7. As análises mostraram que a reatividade foi positiva para marcadores de superfície CD49, CD73, CD90 e CD105 e negativa para marcadores CD14, CD34, CD45 e HLA-DR.

3.13.2 Diferenciação

As CMM provenientes de cultivos em frasco spinner (pré e pós cultivo) foram induzidas a diferenciação em adipócitos e osteócitos. A diferenciação em adipócitos foi evidenciada quando as gotículas de gordura começaram a surgir no interior das células e foram observadas após a coloração com Sudam II. Dessa forma, foi evidenciada uma boa diferenciação nas amostras pré e pós cultivo. Já a diferenciação morfológica em osteócitos foi evidenciada pelo acúmulo de cristais de oxalato de cálcio corados com Vom Kossa.

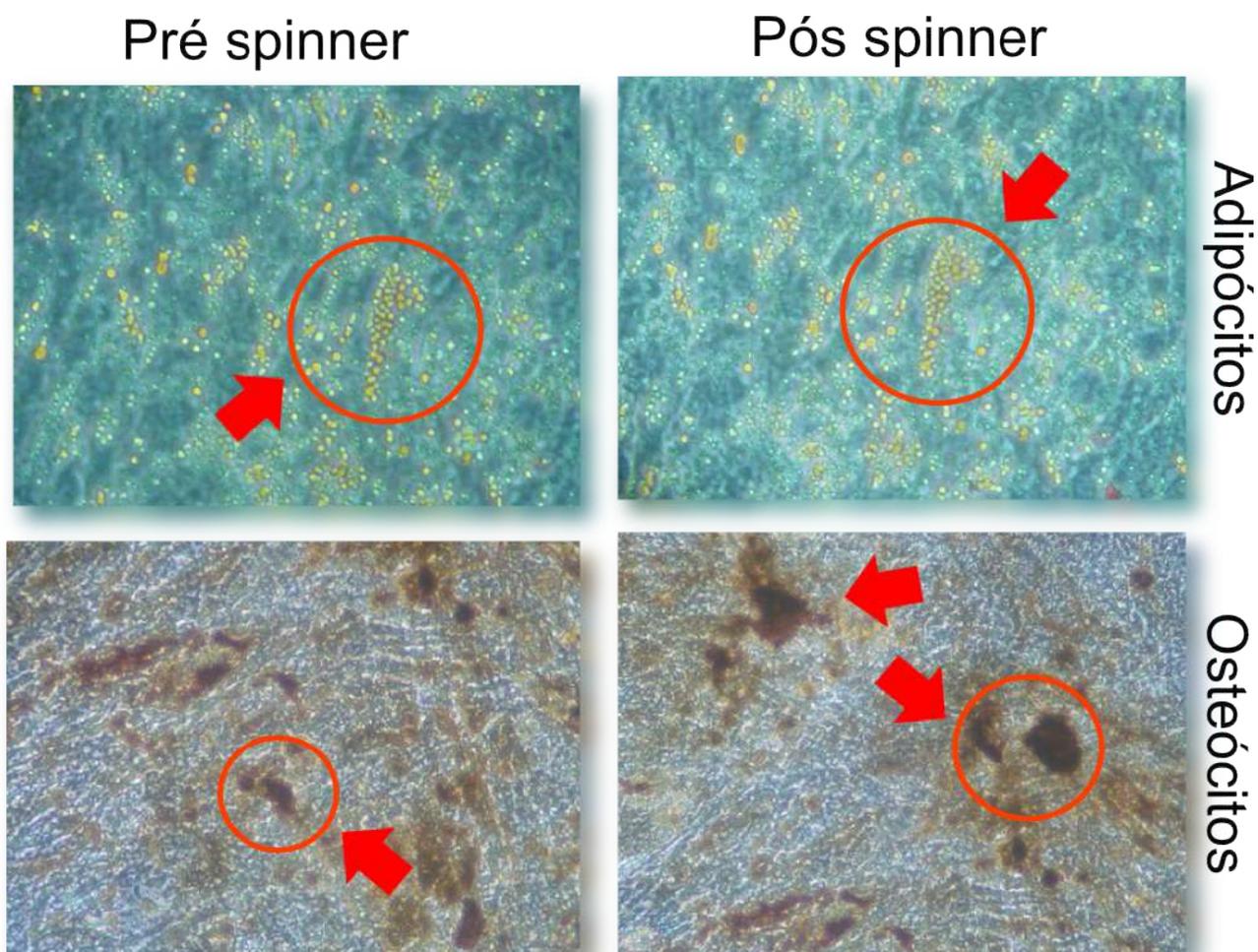


Figura 3.20 – Diferenciação das células em adipócitos e osteócitos pré e pós cultivo da linhagem hMSC-TERT cultivada em frasco spinner com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL; 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S®.

3.14 Análise geral dos experimentos realizados

De maneira geral e após os experimentos realizados comprova-se que a tecnologia de cultivo de CMM em microcarregadores é possível e promissora, desta forma foram corroborados parâmetros importantes que afetam a dinâmica do crescimento celular como: μ_{max} , a taxa de consumo e produção de nutrientes e metabólitos, em comparação com os apresentados na literatura para CMM de porco (FRAUENSCHUH et al., 2007); CMM humanas (EIBES et al., 2010) e CMM de cabra (SCHOP et al., 2008).

O número maior de células alcançado foi de 8.06×10^7 células sem a correção do fator de diluição (FD) e de $1,44 \times 10^8$ com a correção do FD no experimento 6 (segundo controle); o que representa um fator de expansão de 13 e 23 vezes respectivamente considerando o número de células inicialmente inoculado. Ao comparar estes valores com os valores obtidos por MENDONÇA, (2013) observa-se uma pequena melhora na produção de células o que pode ser explicado pela suplementação do meio com arginina, não obstante a melhora não foi maior devido a presença de grandes aglomerados de microcarregadores e a concentrações de metabólitos tóxicos principalmente a amônia. É reportado na literatura que valores acima de 2,4 mM são inibitórios para culturas de CMM humanas, (SCHOP et al., 2009). Assim, neste trabalho se reportarem valores até o dobro do valor inibitório, efeito que tentou-se reduzir com as trocas de meio, porém não foi efetivo.

Com referência ao consumo de nutrientes o aminoácido semi-essencial arginina, foi importante em todos os cultivos este aminoácido é um precursor da L-ornitina cujo metabolismo leva a produção da L- prolina, componente essencial do colágeno (MUNDER et al., 2009), que por sua vez é uma proteína indispensável nos processos de formação da matriz extracelular. Com a formação da matriz extracelular comprometida pela falta deste aminoácido torna-se difícil obter valores de número de células altos para o cultivo.

Outro fato importante de mencionar é a comparação entre o consumo de arginina das células em presença do SD, experimentos 3,4,5,e 7 e sem ele nos experimentos 2 e 6. De forma geral observa-se,um aumento no consumo deste aminoácido, na presença das duas concentrações (0,05% e 0,01%) de SD, o que sugere uma possível mudança no metabolismo das células em relação a este aditivo. Na literatura encontra-se uma relação entre o sulfato de dextrana e arginina nos trabalhos de Coburn e colaboradores (2012),eles demonstraram a nível genético que metabolismo de L-Arg é alterado em modelos de animais que apresentam quadros de doença inflamatória intestinal induzidas pela ação do sulfato de dextrana (OKAYASU, et al., 1990). Análise genômica por microarray revelou múltiplos genes diferencialmente expressos após exposição ao SD e muitas dessas mudanças foram revogadas com a suplementação de arginina, este fato poderia explicar o consumo maior de arginina em presença de SD.

Com respeito às análises de aglomerados feitas neste trabalho, se destacam duas situações. A primeira leva em consideração a necessidade da presença de aglomerados médios que definimos como aqueles que se encontram na faixa dos 500 a 700 μ_m os quais são necessários para incentivar o crescimento celular já que favorecem a criação de condições de hipoxia, que geram número maiores de células em comparação com as condições de normoxia, esta melhora pode ser explicada pelo início precoce da fase de crescimento exponencial, e suportados por um aumento na eficiência do metabolismo celular. (SANTOS et al., 2010).

Em uma situação ideal a manutenção destes aglomerados médios, pode garantir valores de crescimento ainda maiores; mas na realidade esta situação muda drasticamente pois estes aglomerados médios tendem a juntarse formando grandes aglomerados (acima de 800 μ_m), situação que torna insustentável o cultivo, ao evitar a entrada de nutrientes e gases, e a posterior morte das células das camadas mas internas dos aglomerados.

Tabela 3.3 – Resumo dos resultados obtidos nos cultivos em frasco spinner de CMM com microcarregador Cultispher- S®.

	Exp 2 (Controle)	Exp 3 (0,05% SD)	Exp 4 (0,05% SD)	Exp 5 (0,01% SD)	Exp 6 (Controle)	Exp 7 (0,01% SD)	Exp 9 (0,01% SD)
Número total de células ($\times 10^{-6}$)	69 / 134*	19 / 31*	21 / 36*	39 / 57*	80 / 144*	48 / 83*	40 / 68*
Fator de Expansão	11/20*	3 /5*	3,3 / 5,7*	4,5 / 6,6*	13 / 23 *	8 / 13 *	6 /11*
Duração (horas)	240	144	144	144	264	240	216
$\mu_{max}(h^{-1})$	0,014	—	—	0,018	0,021	0,016	0,010
Possível causa do fim da fase exponencial	pH /Amônia	Baixa concentração Arginina	Efeito inibidor do aditivo SD 0,05%	pH	Amônia	Arginina Amônia	Efeito do Anti-aglomerante Anti-clumping (GIBCO)

*Valores com a correção do fator de diluição (FD).

Na Tabela 3.3 são apresentados uma comparação dos resultados obtidos nos experimentos anteriormente descritos. Assim pode ser evidenciado que a concentração de 0,01% de SD não prejudica o crescimento celular, contudo são necessárias melhoras no sistema de cultivo para evitar o acúmulo de metabólitos e o esgotamento de nutrientes para permitir manter a fase exponencial. Referente ao uso do anti aglomerante Anti-clumping (GIBCO, EUA) ele se mostrou efetivo na redução da formação de aglomerados no entanto são necessários mais experimentos para determinar os valores e os sistemas de adição no cultivo para garantir melhoras nos fatores de expansão.

4 CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos no presente trabalho, podemos concluir:

- a. O cultivo da linhagem hMSC-TERT é possível no sistema de biorreator agitado de tipo frasco spinner, com adição de microcarregadores Cultispher-S como superfície de ancoragem disponível para as células.
- b. Foi possível obter valores máximos de $8,06 \times 10^7$ células, sem a correção do fator de diluição (F.D), e de $1,44 \times 10^8$, com a correção do F.D; o que representa fatores de expansão de 13 e 23 vezes, respectivamente, considerando o número de células inicialmente inoculado. As células apresentaram uma velocidade específica de crescimento máxima de $0,021 \text{ h}^{-1}$, o que corresponde a um tempo de geração de 32,8 horas.
- c. Foi possível avaliar a influência do aditivo sulfato de dextrana nas concentrações de 0,05 e 0,01% SD.
- d. A concentração de 0,05% S.D não foi eficiente como estratégia de modulação da formação de aglomerados, pois teve um efeito inibidor no crescimento celular. Já concentração de 0,01% de S.D se mostrou promissora pois, embora não tenha alcançado concentrações tão altas quanto o controle, permitiu o crescimento normal das células até uma determinada parte do cultivo, o que se traduz em velocidades específicas de crescimento máximo parecidas aos controles.
- e. As análises de nutrientes permitiu evidenciar que o aminoácido semi-essencial arginina foi o mais consumido pela célula na presença do aditivo S.D, em qualquer das condições testadas.
- f. As análises dos metabólitos demonstram que os cultivos foram afetados por concentrações inibitórias de amônia.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como recomendação para trabalhos futuros, sugere-se:

- a. Modificar os regimes de troca de meio com a finalidade de evitar atingir valores próximos de zero da arginina e valores inibitórios da amônia. Assim, em vez de realizar a troca da metade do meio as 24 horas, recomenda-se realizar trocas de 25% do total de meio a cada 12 horas, o que atenuaria as condições de estresse observadas.
- b. Uma vez realizadas estas modificações nos regimes de alimentação para garantir um meio ambiente celular agradável, pode-se testar novamente a concentração de 0,01% S.D. e observar seu efeito no cultivo sem a influência dos fatores limitantes da arginina e inibitórios do amônio.
- c. São necessários mais estudos com o produto comercial anti-clumping com o intuito de caracterizar sua influência em culturas de células aderentes, já que foi comprovado que as concentrações já testadas não tem um efeito tóxico para as células.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, B; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Therapy*, v. 15, n. 2, p. 109-16, 2008.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. London: Garland Science 2007.

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

ASHTON RS, KEUNG AJ, PELTIER JL, SCHAFFER DV. Progress and prospects for stem cell engineering. *Annu Rev Chem Biomol Eng* doi:10.1146/annurevchembioeng-061010-114105,2011.

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

BARTOSH TJ, YLOSTALO JH, MOHAMMADIPOOR A, BAZHANOV N, COBLE K., CLAYPOOL K, LEE RH, CHOI H, PROCKOP DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.107,p.13724–13729 2010.

BOBIS, S. et al. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*,v.44, p.215-230, 2006

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

BORYS MC, PAPOUTSAKIS ET. Formation of bridges and large cellular clumps in CHO-cell microcarrier cultures: effects of agitation, dimethyl sulfoxide and calf serum. *Cytotechnology*. v.8, p.237–248, 1992.

BROWN, JM.; MEZEY,E. Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Mast Cell Function via a COX2-dependant Mechanism. *Clinical Exp. Allergy* (2011): n. pag. Web. 7 Dec. 2013.

BRUNSTEIN, C.; WAGNER, J.; Umbilical cord blood transplantation ans banking. *Annu Rev. Med*, v57, p 403-17,2006.

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

- CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.
- CARUSO, S. R. Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de células mesenquimais estromais multipotentes em microcarregadores. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.
- CHERRY RS AND PAPOUTSAKIS ET. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnol. Bioeng*, v.32: p. 1001-1014, 1988.
- CHICO, E.; RODRIGREZ, G.; FIGUEREDO, A.; Biorreatores para Células Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo, Editora Roca, p.216-254, 2008.
- COBURN, L.; GONG, X.; SINGH, K.; ASIM, M.; SCULL, B.L-arginine Supplementation Improves Responses to Injury and Inflammation in Dextran Sulfate Sodium Colitis. doi:10.1371/journal.pone.0033546,2012.
- COVAS, D. T.; SIUFI, J. L. C.; SILVA, A. R. L. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 36, n.9, p. 1179-1183, 2003.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v. 119, p. 2204-2213, 2006.
- DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potencial clinical uses. *Experimental Hematology*, v.28,p.875-884, 2000.
- DEE, K.U.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. Inducing single-cell suspension of BTITN5B1-4 insect cells: I. the use of sulfated polyanions to prevent cell aggregation and enhance recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, v.54, n. 3, p. 191- 205, 1997.
- DOS SANTOS, F.; ANDRADE, P. Z.; BOURA, J. S.; ABECASIS, M. M.; SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *Journal of Cellular Physiology*, v. 223, n. 1, p.27-35, 2010.
- DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology, New York: John Wiley & Sons, p.352, 1998.

- EIBES, G.; DOS SANTOS, F.; ANDRADE, P. Z.; BOURA, J. S.; ABECASIS, M. M. A.; DA SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of Biotechnology*, v. 146, n. 4, p. 194-197, 2010.
- FERNANDES, A. M.; FERNANDES, T. G.; DIOGO, M. M.; SILVA, C. L.; HENRIQUE, D.; CABRAL, J. M. S.; Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of Biotechnology, Portugal*, v. 132, p. 227-236, 2007.
- FERNANDES, R.; WENCESLAU, C.; REGINATO, A.; KERKIS, I.; MIGLINO, M. Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantoins and amniotic fluids at the third trimester of gestation. *Placenta*, v.33,n.8,p.640 – 4, 2012.
- FERRARI, C.; BALANDRAS, F.; GUEDON, E.; OLMOS, E.; CHEVALOT, I.; MARC, A. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. *Biotechnology Progress*, v. 28, n. 3, p. 780-787, 2012.
- FRAUENSCHUH, S.; REICHMANN, E.; IBOLD, Y.; GOETZ, P. M.; SITTINGER, M.; RINGE, J. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. *Biotechnology Progress*, v. 23, n. 1, p. 187-193, 2007.
- FUKUCHI, Y.; NAKAYIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human placenta derived cells have mesenchymal stem progenitor cell potencial. *Stem cells*. v. 22, n. 4, p. 649-658, 2004.
- GIRI, S. N., BENSON, J., SIEGEL, D.M., RICE, S.A., SCHIEDT, M. *Proc Soc Exptl Biol Med*, v.150, p. 180, 1975.
- GODARA, P.; NORDON, R. E.; MCFARLAND, C. D. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, n. 4, p. 397-407, 2008.
- GOMES, D. Células-tronco embrionárias: implicações bioéticas e jurídicas. *Centro Universitário São Camilo*.v.1,p.78-87,2007.
- GOUDAR CT, MATANGUIHAN R, LONG E, CRUZ C, ZHANG C, PIRET JM, KONSTANTINOV KB. Decreased CO₂ accumulation by eliminating bicarbonate addition to high cell-density cultures. *Biotechnol Bioeng*, v.96,p.1107–1117. 2007.
- HORWITZ EM, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v.7, p.393-395, 2005.
- HUAN-TING L.; MAKOTO O.; HIROMITSU N. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Phil. Trans. R. Soc.* 20110334, published 19 November 2012.

- JEANS, A., HAYNES, W.C., WILHAM, C.A., RANKIN, J.C., MELVIN, E.H., AUSTIN, M.J., CLUSKEY, J.E., FISHER, B.E. TSUCHIYA, H.M.; RIST, C. E. Characterisation and Classification of Dextran from Ninety-six Strains of bacteria. *J. Am. Chem.Soc.*, 76, 5041, 1954.
- KARTHIKEYAN, R.; RAKSHIT, S.; BARADARAJAN, A. Optimization of batch fermentation conditions for dextran production. *Bioprocess Engineering*. V.15. 247–251. 1996.
- KASSEM, M.; KRISTIENSEN, M.; ABDALLAH, B. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential use in Therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v.95, p.209-214, 2004.
- KEATING A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*, v.13, p.419-425, 2006.
- KING, J. A.; MILLER, W. M. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation, *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11, n. 4, p. 394-398, 2007.
- KIROUAC DC, ZANDSTRA PW. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell*, v.3, p.369–81, 2008.
- KOLF CM, CHO E, TUAN RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. v.9, p.204, 2007.
- LANDAUER, K ; DURRSCHMID, M; KLUG, M; WIEDERKUM, S; BLUML, G; DOBLHOFF-DIER, G. Detachment factors for enhanced carrier to carrier transfer of CHO cell lines on macroporous microcarriers. *Cytotechnology*, v.39, p. 37–45, 2002.
- LIU, M; GOUDAR, C. Gene Expression Profiling for Mechanistic Understanding of Cellular Aggregation in Mammalian Cell Perfusion Cultures *Biotechnology and Bioengineering*, v. 110, p.483-490, 2013.
- LÓPEZ, A.F. Análisis comparativo de células hek293 en cultivo y producción de adenovirus. Trabajo de conclusión de curso – Departamento de Ingeniería Química e Biotecnología, Universidad de Chile, 2010.
- MALDA, J., VAN DEN BRINK, P., MEEUWSE, P., GROJEC, M., MARTENS, D.E., TRAMPER, J., RIESLE, J., VAN BLITTERSWIJK, C.A.. Effect of oxygen tension on adult articular chondrocytes in microcarrier bioreactor culture. *Tissue Eng*, v.10, p.987–994, 2004.
- MALDA, J.; FRONDOZA, C.G. Microcarriers in the engineering of cartilage and bone. *Trends Biotechnology*, v.24, n. 7, p.299-304, 2006.

- MARTIN, I.; WENT, D.; HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, v. 22, p. 80-85, 2004.
- MATSUMIYA, A.; YAMAGUCHI, M.; NAKANO, H.; TAKEDA, M.; KUMADA, K.; Dextran sulfate inhibits E-selectin-mediated neutrophil adhesion to endotoxin-activated vascular endothelial cells. *Life Sci*, v.64, p.9-17, 1999.
- MCCURDY, R. D., H. D GOFF AND D. W. STANELY. *Food Hydrocolloids*, v. 8, p. 625-633. 1994.
- MENDONÇA, M. L. Expansão de células mesenquimais estromais em frasco spinner e avaliação de aditivos para diminuir a aglomeração de microcarregadores Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos. 2013.
- MIHARA, K.; IMAI, C.; SMITH, E. C.; DOME, J. S.; DOMINICI, M.; VANIN, E.; CAMPANA, D.; Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *British Journal of Haematology*, USA, v. 120, p. 846-849, 2003. Short report.
- MIMEAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K.; Stem Cells: A Revolution in Therapeutics - Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, USA, v. 82, p. 252-264, 2009.
- MIZUKAMI, A. Expansão in vitro de células-tronco mesenquimais cultivadas em biorreator de fibra oca. 2011. 145f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Univesidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2011.
- MOHYELDIN, A; GARZON-MUVDI, T; QUIÑONES-HINOJOSA, A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Review*. 2010.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p.55-63.1983.
- MUNDER M; CHOI BS; ROGERS M; KROPF P. L-arginine deprivation impairs Leishmania major-specific T-cell responses. *Eur J Immunol*; v.39, p.2161-72,2009.
- MURATA, M.; ETO, Y.; SHIBAI, H. Large-scale production of erythroid differentiation factor (EDF) by gene-engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells in suspension culture. *J. Ferment. Technol*, v. 66, p. 501-507, 1988.

NAGAYA, N.; KANGAWA, K.; ITOH, T.; IWASE, T.; MURAKAMI, S.; MIYAHARA, Y.; FUJII, T.; UEMATSU, M.; OHGUSHI, H.; YAMAGISHI, M. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, v.112, p.1128–1135, 2006.

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

OHLSON S., BRANSCOMB J. AND NILSSON K. Bead-to bead transfer of Chinese hamster ovary cells using macroporous microcarriers. *Cytotechnology*, v.14, p. 67–80, 1994.

OKAYASU I, HATAKEYAMA S, YAMADA M, OHKUSA T, INAGAKI Y, ET AL. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, v. 98, p.694–702, 1990.

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

PRILLIMAN, K.; LINDSEY, M.; ZUO, Y.; JACKSON, K. W.; ZHANG, Y.; HILDEBRAND, W. Large-scale production of class I bound peptides: assigning a signature to HLA-Bx1501. *Immunogenetics*, v. 45, n. 6, p. 379-385, 1997.

PRUSA, A.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BETTELHEIN, D.; LUBEC, G.; POLLACK, A. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*, v.191, p. 309- 14, 2004.

RENNER WA, JORDAN M, EPPENBERGER HM, LEIST C. Cell–cell adhesion and aggregation: influence on the growth behavior of CHO cells. *Biotechnol Bioeng* v.41, p.188–93, 1993.

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

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

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

- SANCHES, S. Expansão de células-tronco mesenquimais em frasco spinner com microcarregadores. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2010.
- SANTOS, E.; HERNÁNDEZ, R. M.; PEDRAZ, J. L.; OLIVE, G. Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: translation from 2D to 3D. *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 6, p. 331-341. 2012.
- SANTOS, D. Avaliação da expansão de células estromais mesenquimais em biorreator de fibra oca. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- SART, S.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Ear mesenchymal stem cells: An efficient adult multipotent cell population fit for rapid and scalable expansion. *Journal of Biotechnology*, v. 139, n. 4, p. 291-299, 2009.
- SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.; BORGART, E.; DE BRUIJN, J. D.; VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 2, n. 2-3, p. 126-135, 2008.
- SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.; VAN RIJN, L. D.; FERNANDES, H.; BLOEM, R. M.; DE BRUIJN, J. D.; VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering: Part A*, v. 15, n. 8, p. 2653–2663. 2009.
- SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 6, p. 457-478, 2011.
- SHAH ALI U. L. Q.; IQBAL, I.; AMAN, A.; SHIREEN, E.; AZHAR, A.; Production of dextran by newly isolated strains of *Leuconostoc mesenteroides* pcsir-4 and pcsir-9. *Turk. J. BIOCHEM*, v.26, p. 21-26. 2006.
- SLACK, J. M.(2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science*, v.287, p.1431-1433. SMITH, A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*, v. 441, n. 29, p. 1060, 2006.
- SUN, L.Y.; HSIEH, D.K.; SYU, W.S.; LI, Y.S.; CHIU, H.T.; CHIOU, T.W.; Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. *Cell Proliferation*, v. 43, p. 445-456, 2010.
- SUN, Y.; DENG, M.; Human Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Allergic Airway Inflammation in Mice. *Stem Cells* ,v.30,p.2692-2699, 2012.

- THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v. 282, p.1145-1147,1998.
- TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, v. 67, n. 67, p. 509-544, 1998.
- VALENTE,J.; GASPAR, V.; ANTUNES,B.; COUNTINHO,P.; CORREIA.; I. *Polymer*.
.doi.org/10.1016/j.Polymer,v.10.032,2012.
- A. L. VAN WEZEL.Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture. *Nature*,v. 216,p. 64-65,1967.
- WAGNER, W.; WEIN F, SECKINGER A, FRANKHAUSER M, WIRKNER U,KRAUSE, U. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*.v.33:1402-1416. 2005.
- WAN LEUNG, H; CHEN,A; CHOO,A; REUVENY,S; STEVE K.W. Agitation can Induce Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Microcarrier Cultures. *Tissue Engineering*, v. 17,p. 165-173, 2011.
- WANG, S; QU, X; CHUNHUA ZHAO,R. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 5 p.19,2012.
- WEBER, C.; POHL, S.; PÖRTNER, R.; WALLRAPP, C.; KASSEM, M.; GEIGLE, P.;CZERMAK, P.; Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *The Open Biomedical Engineering Journal*, v. 1, p. 38-46, 2007.
- YANG, Y.; ROSSI, F. M. V.; PUTNINS, E. E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials*, v. 28, n. 20, p. 3110-3120, 2007.
- YAZAKI, P. J.; SHIVELY, L.; CLARK, C.; CHEUNG, C. W.; LE, W.; SZPIKOWSKA, B.; SHIVELY, J. E.; RAUBITSCHKEK, A. A.; WU, A. M. Mammalian expression and hollow fiber bioreactor production of recombinant anti-CEA diabody and minibody for clinical applications. *Journal of Immunological Methods*, v. 253, n. 1-2, p. 195-208, 2001.
- YE, H.; CUI, Z. F.; ELLIS, M. J.; MACEDO, H.; MANTALARIS, A. Hollow fiber membrane bioreactor technology for tissue engineering and stem cell therapy. In: DRIOLI, E.; GIORNO, L. *Comprehensive Membrane Science and Engineering*, Oxford: Elsevier, p. 213-227, 2010.
- YING J., EGAN,.QIAN,Y; BORYS,M; ABU-ABSI,N; LI,Z.Dextran sulfate inhibits staurosporine-induced apoptosis in Chinese hamster ovary (CHO) cells: Involvement of the mitochondrial pathway.*Process Biochemistry* v.46,p.427-432, 2011.

ZANGHI JA, RENNER WA, BAILEY JE, FUSSENEGGER M. The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures. *Biotechnol Prog.*v.16,p.319–25, 2000.

ZHANG, S.; GE, J.; SUN, A.; XU, D.; QIAN, J.; LIN, J.; ZHAO, Y.; HU, H.; LI, Y.; WANG K. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem*,v.99, p.1132–1147, 2006.

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