

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI 0710777-3 A2



(22) Data de Depósito: 24/04/2007
(43) Data da Publicação: 10/01/2012
(RPI 2140)

(51) Int.CI.:
C12N 5/00
C12N 5/071

(54) Título: SUBSTRATO DE CULTURA CELULAR, MÉTODO PARA CULTURA DE CÉLULAS, E PROCESSO PARA A FORMAÇÃO DE UM MATERIAL POLIMÉRICO MICROCELULAR

(30) Prioridade Unionista: 28/04/2006 GB 0608403.2, 20/05/2006 GB 0610120.8, 12/01/2007 GB 0700592.9, 28/04/2006 GB 0608403.2, 12/01/2007 GB 0700592.9

(73) Titular(es): Reinnervate Limited

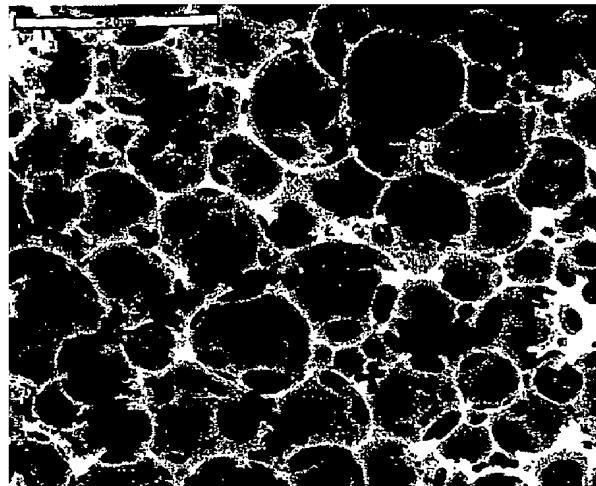
(72) Inventor(es): Neil Cameron, Stefan Alexander Przyborski

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007001464 de 24/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/125288 de 08/11/2007

(57) Resumo: SUBSTRATO DE CULTURA CELULAR, MÉTODO PARA CULTURA DE CÉLULAS, E, PROCESSO PARA A FORMAÇÃO DE UM MATERIAL POLIMÉRICO MICROCELULAR É descrito um substrato de cultura celular compreendendo um polímero em emulsão de fase interna altamente polimerizada adaptado e modificado para uso na cultura de rotina de células em três dimensões; tipicamente células de mamífero e o uso do substrato em um sistema de cultura celular para investigação e análise de proliferação, diferenciação e função celular.



“SUBSTRATO DE CULTURA CELULAR, MÉTODO PARA CULTURA DE CÉLULAS, E, PROCESSO PARA A FORMAÇÃO DE UM MATERIAL POLIMÉRICO MICROCELULAR”

A invenção diz respeito a um substrato de cultura celular 5 compreendendo um polímero em emulsão de fase interna altamente polimerizada (poliHIPE) adaptado para instalação e uso em artigos de plástico de cultura celular já existentes para o crescimento de células, tipicamente células de mamífero, e ao uso do substrato em um sistema de cultura celular para a análise de proliferação, diferenciação e função celular.

10 A cultura de células eucarióticas, por exemplo, células de mamífero, tornou-se um procedimento de rotina, e condições de cultura celular que permitem que as células se proliferem, diferenciem e funcionem são bem definidas. Tipicamente, cultura celular de células de mamífero requer 15 um vaso estéril, normalmente fabricado a partir de plásticos (tipicamente poliestireno), meio de crescimento definido e, em alguns exemplos, células alimentadoras e soro, tipicamente soro de bezerro. As células alimentadoras funcionam para fornecer sinais que estimulam a proliferação celular e/ou manter as células em um estado não diferenciado, e poder influenciar na 20 função celular. A cultura de células procarióticas, por exemplo, células bacterianas, também é uma técnica estabelecida e tem sido usada por muitos anos para a produção de moléculas valiosas.

A cultura de células de mamífero tem muitas aplicações e existem inúmeros ensaios e modelos *in vitro* onde a cultura celular é usada 25 para experimentação e pesquisa; por exemplo, o uso de células na engenharia de tecidos; o uso de sistemas de expressão de mamífero para a produção de proteína recombinante e o uso de células de mamífero na seleção inicial de

medicamentos.

A engenharia de tecido é uma ciência que tem implicações com relação a muitas áreas de cirurgia clínica e cosmética. Mais particularmente, engenharia de tecido diz respeito à substituição e/ou restauração e/ou reparo de tecidos danificados e/ou doentes para retornar ao tecido e/ou órgão a um estado funcional. Por exemplo, engenharia de tecido é usada na provisão de enxertos de pele para reparar feridas que ocorrem em conseqüência de contusões, ou queimadas, ou deficiência de cicatrização do tecido em virtude de úlceras venosas ou diabéticas. Engenharia de tecido requer cultura *in vitro* de tecido de substituição seguido por aplicação cirúrgica do tecido a uma ferida a ser reparada.

A produção de proteína recombinante em sistemas de expressão celular é baseada tanto na expressão de célula procariótica quanto na expressão de célula eucarióticas. A última é preferida, quando modificações pós-tradução para a proteína são necessárias. Sistemas eucarióticos incluem o uso de células de mamífero, por exemplo, células de ovário de Hamster chinês; células de insetos, por exemplo, *Spadoptera spp*; ou levedura, por exemplo, *Saccharomyces spp*, *Pichia spp*. A produção em grande escala de proteína recombinantes requer um alto padrão de controle de qualidade, uma vez que muitas destas proteínas são usadas como produtos farmacêuticos, por exemplo: hormônio do crescimento; leptina; eritropoietina; prolactina; TNF, interleucinas; fator que estimula a colônia de granulócito (G-CSF); fator que estimula a colônia de macrófago graulócito (GM-CSF); fator neurotrófico ciliar, (CNTF); cardiotropina-1 (CT-1); fator inibitório de leucemia, oncostatina M (OSM); interferon, IFN α , IFN γ . Além disso, o desenvolvimento de vacinas, particularmente vacinas de subunidades,

(vacinas a base de um antígeno definido, por exemplo, p120 de HIV), requer a produção de grandes quantidades de proteína pura livre de antígenos de contaminação que podem provocar anafilaxia. Em algumas situações, é desejável fabricar proteína recombinante em células que são diferenciadas e capazes de processar o polipeptídeo expresso. O processamento pós-tradução inclui o processamento proteolítico de proteínas precursoras e a adição ou remoção de grupos químicos (por exemplo, fosforilação, prenilação, glicosilação, farnesilação).

Além disso, células de mamífero são usadas na seleção de medicamento inicial para determinar se um agente terapêutico de liderança (por exemplo, um agonista ou antagonista de molécula pequena, um anticorpo monoclonal, peptídeo terapêutico, aptâmero de ácido nucleico, RNA inibitório pequeno (RNAsi)) têm eficácia antes de os experimentos animais serem realizados.

Existe uma necessidade de fornecer melhores sistemas de cultura celular em que células de mamífero podem ser cultivadas para fornecer uma população de células que é o mais tecnicamente possível próxima de seu estado natural para possibilitar a análise de proliferação celular, diferenciação e função de uma maneira confiável.

Sistemas de cultura celular são conhecidos na tecnologia e encontram-se disponíveis aos versados na tecnologia há muitos anos. Cultura celular tipicamente envolve o crescimento de células em cultura monocamada em condições estéreis em vasos de cultura celular fechados. Mais recentemente, sistemas de cultura celular foram desenvolvidos que fornecem meios pelos quais células podem ser cultivadas em 3 dimensões para mais intimamente parecer-se à situação encontrada *in vivo*. Por exemplo,

WO2003/014334 descreve um método de cultura celular *in vitro* que fornece um regime de cultura que permite que células epiteliais da próstata formem ácinos tipo próstata que intimamente se parecem aos ácinos de próstata encontrados *in vivo*. Estes têm utilidade no teste da eficácia de agentes 5 anticancerígenos com relação ao controle de proliferação ou metástase de células de câncer de próstata, uma vez que células epiteliais da próstata transformadas também formam ácinos no sistema de cultura celular.

Além disso, substratos de culturas celulares são descritos em W000/34454, cujo conteúdo está aqui incorporado pela referência na sua 10 íntegra, que compreende materiais poliméricos microcelulares que são descritos como polímeros poliHIPE. Estes polímeros formam estruturas reticuladas de poros que interconectam um com o outro para fornecer um substrato ao qual células podem anexar e proliferar. O processo para a 15 formação de poliHIPEs permite que o volume do poro seja exatamente controlado com o volume do poro variando de 75% a 97%. Tamanhos de poro podem variar entre 0,1 a 1.000 mícron e o diâmetro dos membros 20 interconexões de poucos mícrons a 100 mícrons. Além disso, os poliHIPEs podem ser combinados com componentes adicionais que facilitam a proliferação e/ou diferenciação celular. PoliHIPEs são, desta forma, substratos versáteis em que células podem anexar e proliferar em um sistema de cultura celular. Processos para a preparação de poliHIPEs são bem 25 conhecidos na tecnologia e também descritos em W02004/005355 e W02004/004880 cada um dos quais está aqui incorporado pela referência na sua íntegra.

PoliHIPEs são comercialmente disponíveis e compreendem, por exemplo, monômeros de estireno de fase de óleo, divinil benzeno e um agente tensoativo, por exemplo, monooleato de sorbitano Span 80. Além do mais, a rigidez do polímero formado durante o processamento do poliHIPE pode ser afetada pela inclusão de um monômero, tal como acrilato de 2-

etilexila. O processo para a formação de poliHIPE a partir de uma emulsão é iniciado pela adição de um catalisador, tal como persulfato de amônio.

Os processos para a fabricação de poliHIPEs em W000/34454, W02004/005355 e W02004/004880 descrevem várias condições para a formação de polímeros. Por exemplo, a concentração de estireno pode variar de 15% (p/p) a 78% (p/p); concentração de agente tensoativo varia entre 14% (p/p) e 15% (p/p) e a adição do monômero acrilato de 2-etilexila varia entre 60% (p/p) e 62% (p/p). Além disso, a descrição nestes pedidos de patente diz respeito à produção de suportes celulares unitários aos quais as células anexam e crescem. Os poliHIPEs resultantes formados por estes processos têm volumes do poro que variam de 75% a 97%.

Descreve-se aqui um processo para a formação de um poliHIPE que tem propriedades superiores especificamente projetadas para as culturas celulares de rotina, tipicamente células de mamífero, quando comparado aos poliHIPEs formados pelos processos da tecnologia anterior. Os poliHIPEs assim formados têm uma porosidade em torno de 90% e são adicionalmente processados em membranas ou camadas finas (por exemplo, por seccionamento do micrótomo) para produzir um substrato de cultura celular compreendendo uma pluralidade de poliHIPE finos adaptados para ajustar aos vasos de cultura celular já existentes. O poliHIPE também é modificado pela inclusão de monômeros e polímeros orgânicos para fornecer um substrato de cultura celular adequado para tipos celulares específicos. O sistema de cultura celular aqui descrito pode ser aplicado tanto a células eucarióticas quanto células procarióticas para fornecer o meio para produzir culturas celulares que refletem mais intimamente as condições *in vivo* para fornecer um sistema de cultura celular mais confiável que tem aplicações, por exemplo, na engenharia de tecido, produção de proteína recombinante e seleção de medicamento.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecido substrato

de cultura celular compreendendo uma pluralidade de material polimérico microcelular seccionado em que o volume do poro do material polimérico microcelular é entre 88% e 92%

5 O volume do poro é definido como a fração do volume total do material que é composto de poros, e é determinado pela fração da gotícula da emulsão originária.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito volume do poro é cerca de 90%.

Determinou-se que membranas de material polimérico
10 microcelular com um volume do poro de cerca de 90% são um substrato surpreendentemente efetivo para crescimento celular. Demonstrou-se que a aderência, proliferação e função celular são significativamente afetadas pela estrutura do material polimérico. As células aderem melhor a materiais de 90% de porosidade e proliferam bem e mostram melhor função sobre as
15 células crescidas em materiais poliméricos com diferentes porosidades (por exemplo, 95% de volume do poro). Além disso, demonstrou-se que a proliferação e função de células crescidas em 90% de materiais poliméricos é significativamente melhor, comparada ao crescimento de células em plástico de cultura de tecido de 2 dimensões convencionais.

20 Em uma modalidade adicionalmente preferida da invenção, o dito substrato compreende um elastômero hidrofóbico em uma concentração entre 20% (p/p) e 40% (p/p) do teor de monômero total.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito elastômero hidrofóbico é fornecido em uma concentração entre 25% (p/p) e 35% (p/p).
25 Preferivelmente a dita concentração é selecionada do grupo que consiste em 26% (p/p); 27% (p/p); 28% (p/p); 29% (p/p); 30% (p/p); 31% (p/p); 32% (p/p); 33% (p/p); ou 34% (p/p).

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito elastômero hidrofóbico é fornecido em uma concentração de 30% (p/p).

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito elastômero é selecionada do grupo que consiste em acrilato de 2-etilexila; acrilato de n-butila e acrilato de n-hexila.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito elastômero 5 é acrilato de 2-etilexila. Preferivelmente o dito acrilato de 2-etilexila é fornecido entre 28% (p/p) e 32% (p/p); preferivelmente acrilato de 2-etilexila é fornecido a cerca de 30% (p/p).

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato de cultura celular compreende polivinila. Preferivelmente o dito polivinila é 10 poliestireno; preferivelmente um poliestireno compreendendo um monômero de estireno e divinilbenzeno.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato de cultura celular compreende um agente tensoativo.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito agente 15 tensoativo é fornecido em uma concentração de 20-30% (p/p) da fase de monômero da emulsão; preferivelmente 24-26% (p/p), e acima de tudo preferivelmente em torno de 25% (p/p).

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato de cultura celular compreende uma pluralidade de material polimérico 20 microcelular seccionado em que as ditas seções são 50-1.000 microns de espessura; preferivelmente as ditas seções são aproximadamente 500-750 microns de espessura. Mais preferivelmente still as ditas seções são 100-200 microns de espessura.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato de cultura celular compreende uma pluralidade de material polimérico 25 microcelular seccionado em que as ditas seções são 50-250 microns de espessura; preferivelmente as ditas seções são aproximadamente 150 microns de espessura.

Em uma modalidade preferida alternativa da invenção o dito

substrato de cultura celular compreende uma pluralidade de material polimérico microcelular seccionado em que as ditas seções são 50-450 mícrons de espessura; preferivelmente as ditas seções são aproximadamente 120 mícrons de espessura.

5 Em uma modalidade preferida da invenção, o dito material microcelular seccionado é aproximadamente 300 mícrons de espessura.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato de cultura celular compreende um monômero orgânico adicional.

10 Em uma modalidade preferida da invenção, o dito monômero orgânico é selecionada do grupo que consiste em: metacrilato de N-butila, metacrilato de n-hexila, acrilato de cicloexila, metacrilato de cicloexila, acrilato de fenila, metacrilato de fenila, cloreto de 3-vinilbenzila, cloreto de 4-vinilbenzila, para-acetoxiestireno.

15 Ainda em uma modalidade adicional da invenção o dito substrato de cultura celular compreende um polímero orgânico adicional.

20 Em uma modalidade preferida da invenção, o dito polímero orgânico é selecionada do grupo que consiste em: poli(metacrilato de N-butila), poli(metacrilato de n-hexila), poli(acrilato de cicloexila), poli(metacrilato de cicloexila), poli(acrilato de fenila), poli(metacrilato de fenila), poli(cloreto de 3-vinilbenzila), poli(cloreto de 4-vinilbenzila), poli(para-acetoxiestireno).

25 Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato de cultura celular compreende uma superfície que foi modificada pela provisão de um revestimento que facilita a anexação, proliferação e/ou diferenciação de células anexadas à superfície.

Em uma modalidade preferida da invenção, a dita modificação é a provisão de um revestimento proteináceo.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito revestimento proteináceo compreende pelo menos uma molécula selecionada

do grupo que consiste em: laminina, colágeno, por exemplo, suportes celulares tipo Matrigel, fibronectina, matrizes de peptídeo a base de não colágeno.

Um exemplo de uma matriz de peptídeo a base de não colágeno é PuraMatrix.

Em uma modalidade preferida alternativa da invenção o dito revestimento proteináceo compreende um revestimento de ácido de polimina.

Poli aminoácidos têm propriedades que imitam proteínas e em particular proteínas às quais células podem ser anexadas e crescer. Poli aminoácidos podem ser homopolímeros ou heteropolímeros. Exemplos de poli aminoácidos usados na cultura celular incluem poli L ornitina e poli L lisina. Revestimentos proteináceos são bem conhecidos na tecnologia. Por exemplo, ver *Cultura of Animal Cells*, Ian Freshney, Wiley-Liss 1994, que está aqui incorporado pela referência na sua íntegra.

Em uma modalidade preferida alternativa da invenção a superfície do dito substrato de cultura celular é fisicamente modificada.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato compreende uma superfície que é modificada por tratamento com plasma gasoso.

O tratamento com plasma gasoso de substratos de culturas celulares é conhecido na tecnologia. O tratamento com plasma pode ser usado para alterar as propriedades físicas de uma superfície de cultura celular. Por exemplo, amônia e oxigênio foram usados como plasmas gasosos para melhorar a anexação e proliferação celular em produtos de cultura celular. O processo envolve a excitação de produtos gasosos em baixas pressões e temperaturas ambientes por energia de radiofreqüência. Os plasmas contêm elétrons livres e outras partículas metaestáveis que mediante colisão com superfícies poliméricas pode modificar a superfície quebrando ligações químicas. Isto cria radicais livres que também modificam a superfície do

polímero.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um vaso de cultura celular compreendendo um substrato de cultura celular de acordo com a invenção.

5 “Vaso de cultura celular” é definido como qualquer meio adequado para conter o substrato de cultura celular descrito anteriormente. Tipicamente, um exemplo de um vaso como este é uma placa de petri; garrafa ou frasco de cultura celular ou placas de cultura de múltiplos poços ou poço inerte. Placas de cultura de múltiplos poços são placas de microtitulação de 10 múltiplos poços com formatos, tais como 6, 12, 48, 96 e 384 poços que são tipicamente usados para compatibilidade com sistemas de carga automatizada e manuseio robótico. Tipicamente, telas de alto rendimento usam misturas homogêneas de agentes com um composto indicador que é tanto convertido quanto modificado resultando na produção de um sinal. O sinal é medido por 15 meios adequados (por exemplo, detecção de emissão de fluorescência, densidade ótica, ou radioatividade) seguido por integração dos sinais a partir de cada poço contendo as células, substrato/agente e composto indicador.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito vaso de cultura celular compreendendo o dito substrato de cultura celular compreende 20 adicionalmente uma célula e meio de cultura celular.

Em uma modalidade preferida da invenção, a dita célula é uma célula eucariótica; preferivelmente a dita célula eucariótica é selecionada do grupo que consiste em: uma célula de mamífero; uma célula de planta; uma célula de fungo; um bolor viscoso.

25 Em uma modalidade preferida da invenção, a dita célula de mamífero é uma célula primata; preferivelmente a dita célula primata é uma célula humana.

Em uma modalidade preferida da invenção, a dita célula de mamífero é selecionada do grupo que consiste em um queratinócito

epidérmico; um fibroblasto.(por exemplo, mucosa dérmica, corneal, intestinal, mucosa oral, bexiga, uretra, próstata, fígado) uma célula epitelial (por exemplo, mucosa corneal, dérmica, corneal, intestinal, mucosa oral, bexiga, uretra, próstata, fígado); uma célula neuronal glial ou célula neural; um hepatócito ou célula Stellate de hepatócito; uma célula mesenquimal; uma célula muscular (cardiomiócito, ou célula de miotubo); uma célula renal; uma célula sanguínea (por exemplo, linfócito CD4+, linfócito CD8+; uma célula β pancreática; ou uma célula endotelial);

5 Em uma modalidade preferida da invenção, a dita célula é uma linha celular derivada de tecido tumoral.

10 Em uma modalidade preferida alternativa da invenção a dita célula de mamífero é uma célula-tronco.

15 Em uma modalidade preferida da invenção, a dita célula-tronco é selecionada do grupo que consiste em: célula-tronco hematopoiética; célula-tronco neural; célula-tronco óssea; célula-tronco muscular; célula-tronco mesenquimal; célula-tronco epitelial (derivada de órgãos, tais como pele, mucosa gastrintestinal, rins, bexiga, glândulas mamárias, útero, próstata e glândulas endócrinas, tal como a pituitária); célula-tronco endodérmica (derivadas de órgãos, tais como o fígado, pâncreas, pulmões e vasos sanguíneos); célula-tronco embrionária; célula germinal embrionária; célula-tronco de carcinoma embrionário.

20 Em uma modalidade preferida da invenção, a dita célula-tronco embrionária/ célula germinal embrionária é uma célula pluripotente e não uma célula totipotente.

25 Em uma modalidade preferida alternativa da invenção a dita célula é uma célula procariótica; preferivelmente uma célula bacteriana.

Em uma modalidade adicionalmente preferida da invenção a dita célula ou linha celular é geneticamente modificada.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito vaso de

cultura celular é um biorreator; preferivelmente o dito biorreator é projetado para ampliar a proliferação, diferenciação e função do dito tipo célula.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecido um método para cultura de células compreendendo as etapas de:

- 5 i) fornecer um vaso de cultura celular compreendendo:
a) células;
b) um substrato de cultura celular de acordo com a invenção;
c) meio de cultura celular suficiente para suportar o crescimento das ditas células; e

10 ii) fornecer condições de cultura celular que promovem a proliferação e/ou diferenciação e/ou função das ditas células.

Em um método preferido da invenção as ditas células são células de mamífero; preferivelmente células humanas.

Em um método preferido da invenção as ditas células são hepatócitos.

Em uma modalidade preferida alternativa da invenção as ditas células são células procarióticas; preferivelmente células bacterianas.

Se microrganismos forem usados no método de cultura celular de acordo com a invenção, elas crescem ou são cultivadas de uma maneira familiar ao versado na tecnologia, dependendo do organismo hospedeiro. Como uma regra, microrganismos crescem em um meio líquido compreendendo uma fonte de carbono, normalmente na forma de açúcares, uma fonte de nitrogênio, normalmente na forma de fontes de nitrogênio orgânico, tais como extrato de levedura ou sais, tais como sulfato de amônio, elementos traço, tais como sais de ferro, manganês e magnésio e, se apropriado, vitaminas, em temperaturas entre 0°C e, 100°C, preferivelmente entre 10°C e 60°C, gaseificando ao mesmo tempo em oxigênio.

O pH do meio líquido pode tanto ser mantido constante, isto é, regulado durante o período de cultura ou não. As culturas podem crescer em

lotes, semi-lotes ou continuamente. Nutrientes podem ser fornecidos no início da fermentação ou alimentados de forma semicontínua ou contínua. Os produtos produzidos podem ser isolados dos organismos, conforme descrito anteriormente por processos conhecidos pelo versado na tecnologia, por exemplo, pode extração, destilação, cristalização e, se apropriado, precipitação com sal, e/ou cromatografia. Com esta finalidade, os organismos podem vantajosamente ser despedaçados antecipadamente. Neste processo, o valor do pH é vantajosamente mantido entre pH 4 e 12, preferivelmente entre pH 6 e 9, especialmente preferivelmente entre pH 7 e 8.

Da forma descrita anteriormente, estes meios que podem ser empregados de acordo com a invenção, normalmente compreendem uma ou mais fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas e/ou elementos traço.

Fontes de carbono preferidas são açúcares, tais como mono-, di- ou polissacarídeos. Exemplos de fontes de carbono são glicose, frutose, manose, galactose, ribose, sorbose, ribulose, lactose, maltose, sacarose, rafinose; amido ou celulose. Açúcares também podem ser adicionados ao meio por meio de compostos complexos, tais como molases ou outros subprodutos do refino de açúcar. A adição de misturas de uma variedade de fontes de carbono também pode ser vantajosa. Outras possíveis fontes de carbono são óleos e gorduras, tais como, por exemplo, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de amendoim e/ou gordura de coco, ácidos graxos, tais como, por exemplo, ácido palmítico, ácido esteárico e/ou ácido linoléico, álcoois e/ou polialcoois, tais como, por exemplo, glicerol, metanol e/ou etanol, e/ou ácidos orgânicos, tais como, por exemplo, ácido acético e/ou ácido lático.

Fontes de nitrogênio são normalmente materiais ou compostos orgânicos ou inorgânicos compreendendo estes compostos. Exemplos de fontes de nitrogênio compreendem, amônia na forma líquida ou gasosa ou sais de amônio, tais como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de

amônio, carbonato de amônio ou nitrato de amônio, nitratos, uréia, aminoácidos ou fontes de nitrogênio complexas, tais como licor de maceração de milho, farinha de soja, proteína de soja, extrato de levedura, extrato de carne e outros. As fontes de nitrogênio podem ser usadas individualmente ou 5 como uma mistura.

Compostos de sis inorgânicos que podem estar presentes no meio compreendem os sais de cloreto, fósforo e sulfato de cálcio, magnésio, sódio, cobalto, molibdênio, potássio, manganês, zinco, cobre e de compostos contendo enxofre inorgânico, tais como, por exemplo, sulfatos, sulfitos, 10 ditionitas, tefrationatos, tiosulfatos, sulfitos, ou ainda compostos de enxofre orgânico, tais como mercaptanos e tióis podem ser usados como fontes de enxofre para a produção de produtos químicos finos contendo enxofre, em particular de metionina.

Ácido fosfórico, diidrogenofosfato de potássio ou 15 hidrogenofosfato de dipotássio ou os sais contendo sódio correspondentes podem ser usados como fontes de fósforo.

Agentes quelantes podem ser adicionados ao meio de maneira a manter os íons metálicos em solução. Agentes quelantes particularmente adequados compreendem diidroxifenóis, tais como catecol ou protocatecuato 20 e ácidos orgânicos, tal como ácido cítrico.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um método para selecionar um agente em que o dito agente afeta a proliferação, diferenciação ou função de uma célula compreendendo as etapas de:

- 25 i) fornecer uma cultura celular compreendendo pelo menos uma célula e um substrato de cultura celular de acordo com a invenção;
- ii) adicionar pelo menos um agente a ser testado; e
- iii) monitorar a atividade do agente com relação à proliferação, diferenciação ou função d as ditas células.

Em um método preferido da invenção a dita célula é um hepatócito.

Em um método preferido da invenção o dito método de triagem inclui as etapas de: confrontar os dados de atividade no (iii) anterior; 5 converter os dados confrontados na forma de dados analisáveis e; opcionalmente fornecer um resultado para os dados analisados.

Inúmeros métodos são conhecidos que geram imagem e extraem informação com relação às mudanças espacial e temporal que ocorrem nas células que expressam, por exemplo, proteínas fluorescentes e 10 outros marcadores da expressão genética, (ver Taylor et al Am. Scientist 80: 322-335, 1992), que está aqui incorporado pela referência. Além disso, US5. 989.835 e US09/031.271, ambos aqui incorporados pela referência, descrevem sistemas óticos para determinar a distribuição ou atividade das 15 moléculas reportadoras fluorescentes nas células para seleção de grande número de agentes de atividade biológica. Os sistemas descritos nas patentes anteriores também descrevem um método computadorizado para processar, 20 armazenar e apresentar os dados gerados.

A seleção de grande número de agentes requer o preparo de arranjos de células para o manuseio de células e a administração de agentes. 25 Dispositivos de ensaio, por exemplo, incluem placas de microtitulação padrão de múltiplos poços com formatos, tais como 6, 12, 48, 96 e 384 poços que são tipicamente usados para compatibilidade com sistemas de carga automatizada ou manuseio robótico. Tipicamente, telas de alto rendimento usam misturas homogêneas de agentes com um composto indicador que tanto é convertido quanto modificado resultando na produção de um sinal. O sinal é medido por meios adequados (por exemplo, detecção de emissão de fluorescência, densidade ótica; ou radioatividade) seguido por integração dos sinais a partir de cada poço contendo as células, agente e composto indicador.

O termo “agente” inclui qualquer molécula pequena,

anticorpo, polipeptídeo, peptídeo, aptâmero, RNA inibitório de fita dupla ou pequeno. Estes podem ser um agonista ou um antagonista.

Antagonistas de molécula pequena incluem agentes quimioterapêuticos usados no tratamento de doenças, tal como câncer.

5 Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são uma classe de proteínas relacionadas estruturalmente consistindo em dois pares de cadeias de polipeptídeo, um par de cadeia leve (L) (baixo peso molecular) (κ ou λ), e um par de cadeia pesada (H) (γ , α , μ , δ e ϵ), todas as quatro ligadas junto por pontes de dissulfíto. Tanto cadeias H quanto L têm regiões que contribuem para a ligação do antígeno e que são altamente variáveis de uma molécula de Ig para a outra. Além do mais, cadeias H e L contêm regiões que são não variáveis ou constantes. As cadeias L consistem em dois domínios. O domínio carbóxi-terminal é essencialmente idêntico entre as cadeias L de um dado tipo e é referido como a região “constante” (C). Os domínios amino terminal 10 variam de cadeia L para cadeia L e contribuem para o sítio de ligação do anticorpo. Em virtude de sua variabilidade, ele é referido como a região “variável” (V). A região variável contém regiões que determinam complementariedade ou CDR's que formam uma cavidade que se liga ao antígeno. As cavidades de ligação compreendem regiões variáveis H e L que 15 contribuem para o reconhecimento do antígeno. É possível criar regiões variáveis simples, então denominadas fragmentos de região variável de anticorpo de cadeia simples (scFv's). Se um hibridoma existir para um anticorpo monoclonal específico, ele é bem conhecido pelos versados na tecnologia para isolar scFv's de mRNA extraído do dito hibridoma por meio de 20 RT PCR. Alternativamente, seleção que apresenta fago pode ser usada para identificar clones que expressam scFv's. Alternativamente os ditos fragmentos 25 são “fragmentos do anticorpo do domínio”. Anticorpos do domínio são a menor parte que se liga de um anticorpo (aproximadamente 13 kDa). Exemplos desta tecnologia são descritos em US 6.248.516, US 6.291.158, US

6.127.197 e EP 0368684 que estão todos aqui incorporados pela referência na sua íntegra.

Aptâmeros são moléculas de ácido nucleico pequenas, normalmente estabelecidas, que compreendem um domínio de ligação para uma molécula alvo. Um método de triagem para identificar aptâmeros é descrito em US 5.270.163 que está aqui incorporado pela referência. Aptâmeros são tipicamente oligonucleotídeos que podem ser oligodesoxinucleotídeos de fita simples, oligoribonucleotídeos, ou oligodesoxinucleotídeos ou oligoribonucleotídeos modificados.

Uma técnica mais recente para especificamente separar a função genética é por meio da introdução de RNA de fita dupla, também referido como RNA inibitório pequeno ou de interferência (RNAsi), em uma célula que resulta na destruição do RNAm complementar da seqüência incluída na molécula de RNAsi. A molécula de RNAsi compreende duas fitas complementares de RNA (uma fita sentido e uma fita anti-sentido) anelada um à outra para formar uma molécula de RNA de fita dupla. A molécula de RNAsi é tipicamente derivada de exons do gene que é para ser separado. O mecanismo de interferência de RNA está sendo elucidado. Muitos organismos respondem à presença de RNA de fita dupla ativando uma cascata que leva à formação de RNAsi. A presença de RNA de fita dupla ativa um complexo de proteína compreendendo RNase III que processa o RNA de fita dupla em fragmentos menores (RNAsis, aproximadamente 21-29 nucleotídeos de comprimento) que se torna parte de um complexo de ribonucleoproteína. O RNAsi age como um guia para o complexo de RNase para clivar RNAm complementar à fita anti-sentido do RNAsi, resultando assim na destruição do RNAm. Um agente baseado em um RNAsi teria valor na determinação da função de um gene específico na proliferação e/ou diferenciação celular.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um método para a identificação de genes associados à diferenciação celular

compreendendo as etapas de

- i) fornecer uma cultura celular compreendendo pelo menos uma célula e um substrato de cultura celular de acordo com a invenção;
- 5 ii) extrair ácido nucleico de células na dita cultura celular;
- iii) colocar o dito ácido nucleico extraído em contato com um arranjo de ácido nucleico; e
- iv) detectar um sinal que indica a ligação do dito ácido nucleico a um par de ligação no dito arranjo de ácido nucleico.

Em um método preferido da invenção a dita célula é um
10 hepatócito.

Preferivelmente o dito método inclui as etapas adicionais de

- i) confrontar o(s) signal(s) gerado(s) pela ligação do dito ácido nucleico ao dito par de ligação;
- 15 ii) converter os sinais confrontados em uma forma de dados analisável e, opcionalmente;
- iii) fornecer um resultado para os dados analisados.

Métodos usados para a identificação de marcadores de diferenciação celular e/ou marcadores de transformação celular incluem técnicas a base de imunogênicos (por exemplo, usando as células como
20 imunógenos complexos para desenvolver anti-soros, por exemplo, para marcadores de superfície celular e similares), técnicas a base de ácido nucleico (por exemplo, triagem diferencial usando cDNA de células normais e transformadas). Também, sabe-se há muitos anos que células tumorais produzem inúmeros抗ígenos específicos de célula tumoral, alguns dos quais
25 são apresentados na superfície da célula tumoral. Estes são geralmente referidos como抗ígenos de rejeição tumoral e são derivados de polipeptídeos grandes referidos como precursores de抗ígeno de rejeição tumoral. Antígenos de rejeição tumoral são apresentados por meio de HLA's para o sistema imune. O sistema imune reconhece estas moléculas como estranhas e

naturalmente seleciona e destrói células que expressam estes抗ígenos. Se uma célula transformada escapa da detecção e se estabelece, um tumor se desenvolve. Vacinas foram desenvolvidas com base em抗ígenos de rejeição tumoral dominantes para fornecer indivíduos com uma defesa pré-formada ao estabelecimento de um tumor. O método de acordo com a invenção fornece um meio para identificar抗ígenos de rejeição tumoral e precursores que terão utilidade com relação ao desenvolvimento de vacina para fazer com que o sistema imune dos próprios pacientes impeça o estabelecimento de tumores.

De acordo com um aspecto ainda adicional da invenção é fornecido um método para analisar *in vitro* o desenvolvimento de células cancerosas de células normais compreendendo

- i) formar uma preparação compreendendo um substrato de cultura celular de acordo com a invenção, incluindo células;
- ii) adicionar pelo menos um agente capaz de induzir transformação celular; e
- iii) monitorar o efeito, ou não, do dito agente na transformação das ditas células.

Em um método preferido da invenção as ditas células são hepatócitos.

Sabe-se bem na tecnologia que existem agentes capazes de transformar uma célula normal em uma célula transformada com muitas das características de células cancerosas. Estes incluem, por exemplo, somente vírus, agentes que intercalam DNA, oncogenes e genes de telomerase.

Da forma aqui usada, o termo “câncer” ou “canceroso” refere-se às células com a capacidade de crescimento autônomo, isto é, um estado ou condição anormal caracterizado por rapidamente proliferar o crescimento celular. Entende-se que o termo inclui todos os tipos de crescimentos cancerosos ou processos oncogênicos, tecidos metastáticos ou células, tecidos ou órgãos transformados malignos, independente do tipo histopatológico ou

estágio de invasividade. O termo “câncer” inclui malignâncias dos vários sistemas de órgão, tais como os que afetam, por exemplo, pulmão, mama, tireóide, linfóide, trato gastrintestinal e genito-urinário, bem como adenocarcinomas que incluem malignâncias, tais como a maioria dos cânceres de cólon, carcinoma da célula renal, câncer de próstata e/ou tumores de testículo, carcinoma de célula não pequena do pulmão, câncer do intestino delgado e câncer do esôfago. O termo “carcinoma” é reconhecido na tecnologia e refere-se às malignâncias dos tecidos epitelial ou endócrino incluindo carcinomas do sistema respiratório, carcinomas do sistema gastrintestinal, carcinomas do sistema genitourinário, carcinomas de testículo, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas do sistema endócrino e melanomas. Carcinomas exemplares incluem os que formam a partir do tecido do cérvix, pulmão, próstata, mama, cabeça e pescoço, cólon e ovário. O termo “carcinoma” também inclui carcinossarcomas, por exemplo, que incluem tumores malignos compostos de tecidos carcinomatosos e sarcomatosos. Um “adenocarcinoma” refere-se a um carcinoma derivado de tecido glandular ou em que as células tumorais formam estruturas glandulares reconhecíveis. O termo “sarcoma” é reconhecido na tecnologia e refere-se a tumores malignos de derivação mesenquimal.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um processo para a formação de um material polimérico microcelular compreendendo as etapas de:

- i) formar uma preparação compreendendo uma emulsão de fase interna alta compreendendo um elastômero hidrofóbico em uma concentração entre 20% (p/p) e 40% (p/p);
- ii) formar uma preparação compreendendo um catalisador;
- iii) combinar as preparações em (i) e (ii); e
- iv) incubar a preparação combinada para permitir a formação de um polímero em emulsão de fase interna alta.

Em um método preferido da invenção o dito elastômero hidrofóbico é fornecido em uma concentração entre 25% (p/p) e 35% (p/p); preferivelmente o dito elastômero hidrofóbico é fornecido em uma concentração de cerca de 30% (p/p).

5 Em um método preferido da invenção o dito elastômero é selecionada do grupo que consiste em: acrilato de 2-etilexila; acrilato de n-butila e acrilato de n-hexila.

Em um método preferido da invenção a temperatura da preparação em ii) é aquecida para uma temperatura entre 50°C e 80°C.

10 Em um método adicionalmente preferido da invenção a dita preparação em ii) é aquecida para 50°C ou 20 60°C ou 80°C.

Em um método adicionalmente preferido da invenção a dita preparação em 1) comprehende um monômero de estireno.

15 Em um método adicionalmente preferido da invenção a dita preparação em i) comprehende divinil benzeno.

Em um método ainda adicionalmente preferido da invenção a dita preparação em i) comprehende um agente tensoativo que é fornecido em uma concentração de 20-30% (p/p); preferivelmente 24-26% (p/p) 30 e acima de tudo preferivelmente a cerca de 25% (p/p).

20 Em um método preferido da invenção a preparação em i) comprehende, 60% (p/p) de estireno; 30% (p/p) de acrilato de 2-etilexila; 10% (p/p) de divinilbenzeno e 25% de agente tensoativo.

25 Em um método preferido da invenção o dito polímero em emulsão de fase interna alta na etapa iv) é seccionado; preferivelmente o dito polímero é seccionado em uma camada ou membrana fina.

Em um método preferido da invenção o dito polímero é modificado por engenharia em uma camada ou membrana fina de aproximadamente 50-150 mícrons de espessura; preferivelmente as ditas membranas têm aproximadamente 120 mícrons de espessura.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um polímero em emulsão de fase interna alta obtido ou obtenível pelo processo de acordo com a invenção.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito polímero 5 em emulsão de fase interna alta tem um volume do poro de cerca de 90%.

De acordo com um aspecto adicional da invenção o dito polímero em emulsão de fase interna alta é para uso na cultura de células.

Em uma modalidade preferida da invenção o polímero em emulsão de fase interna alta tem um volume do poro de cerca de 90%; 10 preferivelmente 90%.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido o uso de um substrato compreendendo um polímero em emulsão de fase interna alta para determinar a toxicidade hepática de um agente.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito agente é um 15 agente quimioterapêutico.

Em uma modalidade preferida alternativa da invenção o dito agente é um vetor de terapia genética viral.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um método para testar a toxicidade hepática de um agente compreendendo as 20 etapas de:

i) fornecer uma cultura celular compreendendo pelo menos uma célula de hepatócito e um substrato de cultura celular de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31;

ii) adicionar pelo menos um agente a ser testado; e

25 iii) monitorar a atividade do agente com relação à proliferação, diferenciação ou função das ditas células do hepatócito como uma medida da toxicidade do agente.

Em um método preferido de acordo com a reivindicação 83 em que o dito agente é um agente quimioterapêutico.

Em um método alternativo preferido da invenção o dito agente é um vetor de terapia genética viral.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um método para o crescimento e diferenciação de um queratinócito e/ou 5 células tronco precursoras de queratinócito compreendendo:

i) formar uma preparação compreendendo um substrato de cultura celular de acordo com a invenção, células alimentadoras de fibroblasto e meio de cultura celular;

10 ii) cultivar as ditas células alimentadoras para fornecer um substrato de cultura celular que é substancialmente revestido com as ditas células alimentadoras;

iii) colocar o dito substrato revestido em contato com queratinócitos e/ou células tronco precursoras de queratinócito; e

15 iv) cultivar a preparação de célula combinada em condições condutivas para o crescimento e diferenciação dos ditos queratinócitos e/ou células tronco precursoras de queratinócitos.

Em um método preferido da invenção as ditas células alimentadoras de fibroblasto são fibroblastos dérmicos.

20 Em um método alternativo preferido da invenção as ditas células alimentadoras de fibroblasto são selecionadas do grupo que consiste em: fibroblastos da córnea, fibroblastos da mucosa intestinal, fibroblastos da mucosa oral, fibroblastos da uretra, ou fibroblastos da bexiga.

Em um método adicionalmente preferido da invenção os ditos queratinócitos são queratinócito epidérmicos.

25 Em um método preferido da invenção os ditos fibroblastos são fibroblastos humanos.

Em um método adicionalmente preferido da invenção os ditos queratinócitos são queratinócitos humanos.

Em um método preferido da invenção a dita preparação

compreende adicionalmente colágeno.

Em um método preferido da invenção colágeno é colágeno tipo 1.

Em um método adicionalmente preferido da invenção o dito colágeno é fornecido como um gel.

Em um método alternativo preferido da invenção o dito colágeno é fornecido em uma solução.

Em um método adicionalmente preferido da invenção pelo menos os ditos queratinócitos são deslocados para entrar em contato com ar, induzindo assim a estratificação de queratinócitos.

Em um método preferido da invenção é fornecido um método para testar um agente compreendendo:

i) formar uma preparação de acordo com a invenção que inclui um agente a ser testado;

ii) monitorar o efeito do dito agente no crescimento e/ou diferenciação celular de queratinócito quando comparado a uma preparação de controle que não inclui o dito agente.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um aparelho para a cultura de células compreendendo um substrato de cultura celular de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, um vaso de cultura celular e um inserto adaptado para cooperar com o dito vaso de cultura celular e contém o dito substrato de cultura celular e as ditas células:

Em uma modalidade preferida da invenção, o dito substrato de cultura celular compreende fibroblastos e queratinócitos.

De acordo ainda com um aspecto adicional da invenção é fornecido o uso de um substrato de acordo com a invenção para a preparação de compósito de pele diferenciado.

Em toda a descrição e reivindicações desta especificação, as palavras “compreende” e “contém” e variações das palavras, por exemplo,

“compreendendo” e “compreende”, significa “incluindo, mas sem limitações”, e não se destina a excluir (e de fato não exclui) outras frações, aditivos, componentes, números inteiros ou etapas.

Em toda a descrição e reivindicações desta especificação, o singular engloba o plural, a menos que o contexto de outra forma necessite. Em particular, onde o artigo indefinido é usado, a especificação deve ser entendida como contemplando pluralidade, bem como singularidade, a menos que o contexto de outra forma necessite.

Aspectos, números inteiros, características, compostos, frações ou grupos químicos descritos em conjunto com um aspecto, modalidade ou exemplo particular da invenção devem ser entendidos como aplicáveis a qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo aqui descrito, a menos que incompatível com ele.

Uma modalidade da invenção será agora descrita a título de exemplo somente e com referência às seguintes figuras:

Figura 1 é um imagem de micrografia de elétron de varredura (SEM) de um material PoliHIPE típico. As cavidades esféricas na figura 1 são lacunas, os furos que unem as lacunas adjacentes são denominados interconexões. Barra da escala = 20 μ m;

Figura 2 mostra imagens SEM de materiais PoliHIPE, preparados com diferentes temperaturas de fase aquosa: (a) temperatura ambiente; (b) 50°C; (c) 60°C; (d) 80°C. Barra da escala = 100 μ m;

Figura 3 ilustra a influência da temperatura da fase aquosa na distribuição do diâmetro da lacuna. De frente para trás: temperatura ambiente, 50°C, 60°C, 80°C;

Figura 4 ilustra distribuição de tamanho interconexão de materiais PoliHIPE produzidos usando diferentes temperatura da fase aquosas: temperatura ambiente (0); 50°C (O); 60°C (A); 80

Figura 5 mostra a influência dos aditivos de fase aquosa na

morfologia PoliHIPE: (a) nenhum aditivo; (b) 1,5% (p/v) de PEG ($M_n = 300$); (c) 4% (v/v) de metanol; (d) 1,5% (v/v) de O. Barra da escala - 50 μm .

Figura 6 ilustra gráficos de distribuição de diâmetro da lacuna para materiais PoliHIPE preparados com aditivos de fase aquosa: (a) PEG (de frente para trás: nenhum PEG, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,5%); (b) metanol (de frente para trás: no metanol, 1%, 2%, 3%, 4%); (c) O (de frente para trás: nenhum THF, 0,4%, 0,8%, 1%, 1,5%). PEG $M_n = 300$; todas as porcentagens expressas como v/v, exceto PEG que é p/v. Em cada caso a fase aquosa foi mantida a temperatura ambiente durante preparação da emulsão;

Figura 7 ilustra a distribuição de tamanha interconexão de materiais PoliHIPE produzidos usando diferentes aditivos de fase aquosa: (a) PEG (\square nenhum PEG, A 0,2%, x 0,4%, O 0,8%, O 1,5%); (b) metanol (\square nenhum metanol, Δ 1%, \diamond 2%, O 3%, x 4%); (c) THF (\square nenhum THF, \diamond 0,4%, Δ 0,8%, x 1%, O 1,5%). PEG $M_n = 300$; todas as porcentagens expressas como v/v, exceto PEG que é p/v. Em cada caso a fase aquosa foi mantida a temperatura ambiente durante a preparação da emulsão;

Figura 8 ilustra coeficiente de autodifusão de água em HIPEs preparados com diferentes aditivos de fase aquosa (Δ nenhum aditivo; \square 1,5% de THF; Δ 1,5% de PEG; O 2% de metanol). PEG $M_n = 300$; todas as porcentagens expressas como v/v, exceto PEG que é p/v. Em cada caso a fase aquosa foi mantida a temperatura ambiente durante a preparação da emulsão;

Figura 9 mostra imagens SEM de materiais PoliHIPE preparados com diferentes concentrações de agente tensoativo (Cs) na presença de aditivos de fase aquosa: 1,5% de THF, Cs = 20%, (a); 1,5% de Cs = 30% (b); 4% de metanol, Cs = 20% (c); 4% de metanol, CS = 30% (d). Barra da escala = 50 μm . PEG $M_n = 300$; todas as porcentagens expressas como v/v, exceto PEG que é p/v. Em cada caso a fase aquosa foi mantida a temperatura ambiente durante a preparação da emulsão.

Figura 10 ilustra gráficos de distribuição de diâmetro da lacuna

para materiais PoliHIPE preparados com diferentes concentrações de agente tensoativo na presença de aditivos: 1,5% de THF (a); 4% de metanol (b). De frente para trás: CS = 30, 25 e 20% (p/p). PEG Mn 300; todas as porcentagens expressas como v/v, exceto PEG que é p/v. Em cada caso a fase aquosa foi 5 mantida a temperatura ambiente durante a preparação da emulsão.

Figura 11 ilustra distribuição de tamanha interconexão de materiais PoliHIPE produzidos usando diferentes concentrações de agente tensoativo (Cs) na presença de aditivos de fase aquosa: (a) 1,5 vol.% de THF; (b) 4 vol.% de metanol (\square : Cs - 20%; Δ : CS 25%; O: CS = 30%; todas as 10 porcentagens expressas como v/v). Em cada caso a fase aquosa foi mantida a temperatura ambiente durante a preparação da emulsão.

Figura 12 ilustra uma aplicação do exemplo de andaimes poliHIPE a base de estireno como membranas finas adaptadas para uso em vasos de cultura celular já existentes, tais como um placa de múltiplos poços 15 ou suplemento de poço.

Figura 13 mostra uma fotografia de suplementos de poço de protótipo que carreiam os 90% de volume do poro do andaime de poliestireno a 20 120 microns de espessura. Estes exemplos são de suplementos projetados para ajustar em placas de cultura de 6 poços (suplemento grande) e de 12 poços (suplementos pequenos).

Figura 14 é um SEM que mostra osteoblastos MG63 cultivados em 90% de volume do poro dos andaimes de poliestireno por 7-28 dias *in vitro*. Estes materiais foram adaptados para uso em artigos de plástico de cultura celular já existentes da forma ilustrada na figura 12.

Figura 15 demonstra que as características de preparação e estruturais do polímero afetam o crescimento de células no andaime (exemplo: 90% versus 95% de volume do poro). Este exemplo mostra como a morfologia da célula é afetada. Micrografias eletrônicas de varredura de 25 osteoblastos MG63 cultivados em andaimes de poliestireno por 7 dias *in vitro*.

Estes materiais foram produzidos usando volumes do poro (PV) de 90% e 95%. (A) Osteoblastos (seta) crescem em 90% dos polímeros espalhados e apresentaram inúmeras lamellipodia (pontas de flecha) melhorando as interações com células vizinhas. (B) Entretanto, células (setas) que crescem em 95% de polímeros mantiveram a aparência redonda e produziram pouca, se presente, lamellipodia. (Imagens são de aumento similar).

Figura 16 ilustra como a estrutura do substrato de crescimento pode influenciar a conduta da célula. Os dados mostram diferenças significativas na taxa de proliferação de crescimento de células em vários tipos de substrato. Especificamente observe a comparação entre polímeros de 90% e 95% volume do poros. Isto demonstra a importância de ajustar estes andaimes para o crescimento celular. A figura mostra dados de um ensaio de proliferação celular MTT de osteoblastos MG63 cultivados que cresceram tanto em 90% quanto 95% de volume do poro (PV) de andaimes de poliestireno, ou plástico de cultura de tecido convencional reto (TCP). Células foram semeadas a 1×10^6 células por poços. Barras representam a média \pm SEM, n=3. Observe que a proliferação celular é significativamente maior em 90% de andaimes comparada ao TCP e 95% de materiais PV. Estes dados também mostram que células proliferaram o mínimo em andaimes preparados com 95% de PV.

Figura 17 ilustra como a estrutura do substrato de crescimento pode influenciar a conduta da célula. Os dados mostram diferenças significativas na taxa de proliferação de crescimento celular em vários tipos de substrato. Especificamente observe a comparação entre polímeros de 90% e 95% de volume do poros. Isto demonstra a importância de ajustar estes andaimes para crescimento celular. A figura mostra dados de um ensaio de proliferação celular MTT de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (MSCs) que cresceram tanto em 90% quanto 95% volume do poro (PV) de andaimes de poliestireno, ou plástico de cultura de tecido

convencional reto (TCP). Células foram semeadas a 1×10^6 células por poço. Barras representam a média \pm SEM, n=3. Novamente, estes dados mostram que a proliferação celular é significativamente maior em 90% de andaimes comparada a TCP e 95% de materiais PV. Além do mais, células proliferaram o 5 mínimo em andaimes preparados com 95% de PV.

Figura 18 mostra diferenças significativas na função de crescimento celular em andaimes de poliestireno de 3-dimensões de 90% de volume do poro comparado ao seu crescimento em plástico de cultura de tecido convencional de 2 dimensões. Ensaio medindo os níveis de fosfatase 10 alcalina em osteoblastos MG63 cultivados em andaimes de 90% de volume do poro (PV) comparado ao plástico de cultura de tecido convencional reto (TCP) por 5 e 7 dias. Células foram semeadas a 1×10^6 células por poço.

Valores foram normalizados para levar em conta qualquer diferença em número de célula. Barras representam a média \pm SEM. Observe 15 que níveis de fosfatase alcalina são significativamente maiores em culturas de osteoblastos que cresceram em poliestireno de 3 dimensões comparado às superfícies de poliestireno retas. Estes dados mostram melhor atividade destas células quando elas crescem no andaime de 3 dimensões comparado ao plástico de cultura de 2 dimensões convencional.

Figura 19 mostra diferenças significativas na função do crescimento celular em andaimes de poliestireno de volume de poro de 90% de 20 3 dimensões, comparado ao seu crescimento em plástico de cultura de tecido de 2 dimensões convencional. Ensaio medindo os níveis de osteocalcina em MSCs derivados de medula óssea induzidas para formar 25 nódulos ósseos em resposta à dexametasona. Células foram cultivadas tanto em andaimes de poliestireno de 90% de volume do poro (PV) quanto plástico de cultura de tecido convencional reto (TCP) por 14 a 35 dias. Células foram semeadas a 1×10^6 células por poço. Valores foram normalizados para considerar qualquer diferença no número de célula. Barras representam a

média \pm SEM, n=3. Observe que as concentrações de osteocalcina são significativamente maiores em culturas de crescimento celular de diferenciação em poliestireno de 3 dimensões comparado às superfícies de poliestireno retas. Estes dados novamente mostram melhor atividade destas células quando crescidas no andaime de 3 dimensões comparado ao plástico de cultura de 2 dimensões convencional.

Figura 20 é uma fotomicrografia de coloração de Von Kossa que mostra a formação de um nódulo ósseo centralmente localizado. O nódulo ósseo foi derivado de linhagens mesenquimais induzidas para diferenciar com dexametasona quando crescidas em um andaime de poliestireno de 90% de volume do poro. Células são contra-coradas com hematoxilina de Mayor.

Figura 21 ilustra como a estrutura do substrato de crescimento pode influenciar a conduta da célula. Os dados exemplificam a vantagem de células em crescimento em um andaime de poliestireno de 90% de volume do poro comparado ao plástico de cultura de tecido convencional. A figura mostra dados de um ensaio de proliferação celular MU de hepatócitos REP G2 cultivados que crescem tanto em andaime de poliestireno de 90% de volume do poro (PV) quanto plástico de cultura de tecido convencional reto (TCP). Células foram semeadas a 1×10^6 células/poço. Barras representam a média \pm SEM, n=3. Observe que a proliferação celular é significativamente maior em 90% dos andaimes comparado ao TCP de 2 dimensões.

Figura 22 ilustra como a estrutura do substrato de crescimento pode influenciar na função celular. Os dados exemplificam a vantagem de células em crescimento em um andaime de poliestireno de 90% de volume do poro comparada ao plástico de cultura de tecido convencional. Ensaio medindo os níveis de produção de albumina a partir de hepatócitos HEP G2 cultivados tanto em andaimes de poliestireno de 90% de volume do poro (PV) quanto em plástico de cultura de tecido convencional reto (TCP) por 1 a 28 dias. Células foram semeadas a 1×10^5 células por poço. Valores foram

normalizados para considerar qualquer diferença no número de célula. Barras representam, a média \pm SEM, n=3. Observe que concentrações de albumina são significativamente maiores em culturas de crescimento celular de diferenciação em poliestireno de 3 dimensões comparado às superfícies de poliestireno retas. Estes dados novamente sugerem melhor atividade destas células quando crescidas no andaime de 3 dimensões comparada às cultivadas na superfície reta do artigo plástico convencional.

Figura 23 ilustra como a estrutura do substrato de crescimento pode influenciar a função celular, neste caso, a melhor tolerância de células ao desafio citotóxico. Os dados exemplificam a vantagem das células em crescimento em um andaime de poliestireno de 90% de volume do poro comparado ao plástico de cultura de tecido convencional. A figura mostra dados de um ensaio de proliferação celular MTT de hepatócitos HEP G2 cultivados crescidos tanto em andaime de poliestireno de 90% de volume do poro (PV) quanto em plástico de cultura de tecido convencional reto (TCP) por 3 dias na presença (125 microM) ou ausência da citotoxina metotrexato (inibidor da síntese de DNA). Células foram semeadas a 1×10^6 células/poço. Barras representam a média \pm SEM, n=3. Observe que a proliferação celular é significativamente maior em 90% andaimes comparada ao TCP de 2 dimensões. Estes dados sugerem que o crescimento celular em andaimes é mais tolerante a esta citotoxina mediante estas condições de crescimento.

Figura 24 ilustra como a estrutura do substrato de crescimento pode influenciar a função celular e adicionalmente exemplificar as diferenças nas células em crescimento em um andaime de poliestireno de 90% de volume do poro comparado ao plástico de cultura de tecido convencional. Ensaio medindo os níveis de transglutaminase em culturas de hepatócitos HEP G2 crescidos tanto em andaimes de poliestireno de 90% de volume do poro (PV) quanto em plástico de cultura de tecido convencional reto (TCP) por 1 a 3 dias. Células foram semeadas a 1×10^6 células por poço. Valores

foram normalizados para considerar qualquer diferença no número de célula. Barras representam a média \pm SEM, n=3. Transglutaminase é uma enzima de reticulação de proteína conhecida como sendo expressa por hepatócitos e é induzida à medida que hepatócitos entram em apoptose. Observe que níveis 5 de transglutaminase são significativamente maiores em culturas de hepatócito crescidas em superfícies de poliestireno retas comparado ao poliestireno de 3 dimensões quando desafiado com concentrações crescentes da citotoxina metotrexato. Estes dados adicionalmente sugerem que células em andaimes 10 são mais tolerantes a estes níveis de desafio citotóxico que pode ser 15 consequência de seu crescimento em condições menos estressantes, diferente das experimentadas por crescimento celular como monocamadas de 2 dimensões;

Figura 25: Micrografias eletrônicas de varredura que 20 apresentam hepatócitos HepG2 cultivados em substratos de poliestireno 2-D (A, B) e 3-D (C-F) tanto por 7 dias (A, C, E) quanto 21 dias (B, D, F). Hepatócitos crescidos em substratos 2-D pareceram significativamente mais 25 heterogêneos na estrutura (A, B), comparado ao crescimento celular em superfícies 3-D (C). Uma densidade de semeadura menor possibilitou a visualização do crescimento celular individual em andaimes 3-D (sc) (D). Células HepG2 desenvolveram formas 3-D complexas e interações com 25 células vizinhas (D). Imagens de amplificação maiores revelaram a expressão de grande número de micro-villi (mv) na superfície de células (E,F). Houve números consistentemente maiores de micro-villi no crescimento celular em 3-D (C-F) comparado ao crescimento celular em superfícies 2-D (A, B). Barra da escala: AD 25 μ m; E, F 5 μ m.

Figura 26: Micrografias eletrônicas de transmissão que mostram as características ultra-estruturais de células HepG2 cultivadas tanto em superfícies 2-D quanto 3-D por 21 dias. (A) Células HepG2 cultivadas em plástico 2D apresentaram inúmeras organelas claramente identificáveis,

incluindo núcleo (n), mitocôndria (mt), retículo endoplasmático rugoso (rER), micro-villi (mv), e gotículas de lipídeo (Id). (B,C) Células HepG2 cultivadas em andaimes de poliestireno (se) crescem em associação íntima com o polímero, completamente rodeando suportes do material conforme apresentado. O imageamento mostrou que o crescimento celular em 3-D também apresentou um arranjo de organelas celulares, tais como núcleo (n), mitocôndria (mt), retículo endoplasmático rugoso (rER), micro-villi (mv), gotículas de lipídeo (Id) e agregados peroxissomais (pc). (D) Micrografia de alta amplificação mostrando a formação de complexos de junção estreita (tj) entre células adjacentes. A lacuna formada entre as células intimamente se parecem um cálculo biliar (be) em que micro-villi (mv) se projeta. Barra da escala: A, B 2 μ m; C 1 μ m; D 500 nm.

Figura 27: Desempenho de células HepG2 cultivadas em substratos de poliestireno 2-D (barras sólidas) e 3-D (barras abertas) cultivadas por 21 dias. (A) A estimativa de viabilidade celular usando ensaio de MTT. (B) A produção de albumina secretada por células HepG2 no meio de cultura. A secreção de albumina foi normalizada para a quantidade total de proteína por poço. Para ambos os experimentos, as células foram semeadas a 1×10^6 células/poço. Dados representam a média ESEM para três repetições independentes. A significância é denotada por **p<0,01 usando o teste U de Mann Whitney.

Figura 28: Desempenho de células HepG2 cultivadas em substratos 2-D (barras sólidas) e 3-D (barras abertas) quando desafiadas pela citotoxina, metotrexato (MTX). Dados mostram que células foram tratadas tanto com veículo sozinho (controle) quanto com 31 μ M de MIX, ou 125 μ M de MTX por até 10 dias. (A) Medição da viabilidade da célula HepG2 usando ensaio MTT. (B) Determinação da atividade metabólica da célula HepG2 pela medição de secreção de albumina no meio de cultura. Níveis de albumina foram normalizados para a quantidade total de proteína por poço. (C)

Estimativa do dano celular da forma determinada pela atividade da transglutaminase. Níveis enzimáticos foram normalizados para a quantidade total de proteína por poço. Para cada experimento (A-C), células foram semeadas a 1×10^6 células/poço. Dados representam a média \pm SEM para três 5 repetições independentes. Significância é denotada por * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ usando o teste U de Mann Whitney.

Figura 29: Micrografias eletrônicas de varredura que mostram o efeito de metotrexato (MTX) na estrutura da superfície de células HepG2. Painéis de imagem mostram que células HepG2 foram cultivadas em 10 substratos 2-D (A,C,E,G) e 3-D (B,D,F,H), tratadas tanto com veículo (controle, nenhum MTX, (A,B)), 8 μ M (C,D), 31 μ M (E,F), ou 125 μ M (G,H) 15 MIX. Observe que micro-villi (mv) na superfície celular é claramente visível em ambas as culturas de controle (A,B) e células expostas a baixas concentrações de MTX (C,D) quando crescidas tanto em substratos 2-D (A, C) quanto 3-D (B, D). Em concentrações mais altas da citotoxina, células crescidas em substratos 2-D possuíram muito pouco micro-villi (E) e a superfície celular mostrou evidência de quebra nos níveis máximos de MTX testado (F). Ao contrário, células HepG2 crescidas em 3-D e expostas a níveis crescentes de MTX permaneceram intactas e apresentaram grande número de 20 micro-villi. Barras de escala: A-H 2 μ m.

Figura 30: O efeito do metotrexato (MTX) na ultra-estrutura das células HepG2. Micrografias mostrando cultivadas em substratos 2-D (A,C,E,G) e 3-D (B,D,F,H), tratadas tanto com veículo (controle, nenhum MTX, (A, B)), 8 μ M (C,D), 31 μ (M,F), ou 125 μ M (G, A) MTX. Imagens de 25 culturas de controle mostram a estrutura de células normais correspondente ao substrato de crescimento (A, B). A maioria das células crescidas no plástico de cultura de tecido reto e expostas a 8 μ M de MTX possuiu arquitetura celular próximo do normal, embora poucas células necróticas fossem identificadas (C, nc). Concentrações crescentes de MTX resultaram na

destruição da vasta maioria de crescimento celular em substratos 2-D (E,G). Membranas nucleares desintegraram e organelas normalmente encontradas em células saudáveis foram identificadas. Houve uma maior presença de grandes espaços vasculares (v) e corpos de membrana conhecidos como 5 autofagolisosomas (ap) (E). Ao contrário, crescimento celular de HepG2 em andaimes 3D manteve sua estrutura e somente um pequeno número de células necróticas (nc) foi identificado em culturas expostas a 125 µM de MTX (H). Barra da escalas A-H 2µm.

Figura 31: Configuração de exemplo para co-cultura 10 organotípica de células epiteliais de pele de mamífero. (A) Suplemento de poço com andaime de poliestireno poroso 3D anexado à base, localizado em poço de cultura de disco de múltiplos poços (por exemplo, placa de 6 poços). Fibroblastos dérmicos crescem em andaime de poliestireno 3D na presença ou 15 ausência de gel de colágeno. (B) Queratinócitos (por exemplo, células HaCaT) semeados na superfície de cultura de fibroblasto dérmico. (C) Exposição de queratinócito epidérmicos ao ar induz a estratificação de célula alcançada neste caso diminuindo o níveo do meio de cultura. Células crescidas nos andaimes 3D são prontamente transferíveis entre diferentes 20 vasos de cultura celular permitindo melhor manuseio pelo usuário.

Figura 32: Micrografias eletrônicas de varredura de 25 fibroblastos dérmicos crescidos em andaimes 3D de poliestireno mostrados em amplificações baixas (A) e altas (B). Setas indicam exposição do andaime abaixo das camadas de células. O suporte estrutural de células melhora o manuseio de culturas para manipulações de rotina pelos usuários.

Figura 33: Estratificação de queratinócitos humanos (HaCaT 25 células) em co-culturas organotípicas com fibroblastos crescidos em 3D. Preparação preparada para análise histológica, seccionada e células epiteliais coradas com Hematoxilina e -Eosina.

Tabela 1. Parâmetros morfológicos de PoliHIPEs preparados

com diferentes temperaturas da fase aquosa e aditivos miscíveis em água;

Tabela 2. Diâmetros de lacuna e interconexão médio de PoliHIPEs preparados com aditivos de fase aquosa, e valores de coeficiente de autodifusão por água nos HIPEs^a originários; e

5 Tabela 3 Influência da concentração do agente tensoativo na morfologia de PoliHIPEs preparados com aditivos de fase aquosa.

Materiais e Métodos para a Produção de Substrato de Crescimento para Uso de Rotina em Cultura Celular

Materiais divinilbenzeno (Aldrich; 80 vol% de divinilbenzeno, 10 o restante sendo m- e p-etilestireno), acrilato de 2-etilexila (Aldrich; 99%) e estireno (Aldrich; 99%) foram passados através de uma coluna de alumina ativada básica (Aldrich; Brockmann 1) para remover qualquer inibidor (4-terc-butilcatecol para estireno e divinilbenzeno e hidroquinona ou hidroquinona de éter monometílico para acetato de 2-etiexila). Persulfato de 15 potássio (Aldrich), monooleato de sorbitano (SPAN 80, Aldrich), poli(etileno glicol) (Aldrich, $M_w = 300$) e cloreto de cálcio desidratado (Aldrich) foram usados como fornecedores.

Preparação de Polímeros de PoliHIPE e Fabricação em Membranas Finas para Cultura Celular

20 Espumas de PoliHIPE foram preparadas usando a polimerização de um HIPE.

• A fase de óleo continha 60% de estireno, 30% de acrilato de 2-etilexila, 10% de divinilbenzeno e 25% de agente tensoativo (monooleato de sorbitano) (todas as% são p/p).

25 • A fase aquosa continha 1% de persulfato de potássio em H₂O deionizada.

Método

1. Resumidamente, a fase de óleo foi colocada em um frasco de fundo redondo de 250 mL de 3 pescoscos, ajustado com um agitador

suspensão (bastão de vidro ajustado com um pá PTFE em forma de D), um funil de gotejamento que equaliza a pressão de 100 mL (inserido em um lado do pescoço) e um septo de borracha. A mistura foi purgada com gás nitrogênio por 15 minutos.

5 2. A fase aquosa foi aquecida até uma temperatura de 80°C usando uma placa quente agitadora e então adicionada à fase de óleo durante um período de 2 minutos a uma taxa constante. A emulsão foi então misturada por mais um minuto.

10 3. A emulsão foi então removida e moldada em um tubo de polipropileno de 50 mL e deixada curar a 60°C durante toda a noite.

4. O polímero foi então removido do tubo depois de 24 horas e lavado extensivamente em um Soxhlet com água e álcool isopropílico por 24 horas cada.

Produção de Membranas Finas

15 Os polímeros foram modificados por engenharia em membranas espessas de 120 micron. Isto pode ser alcançado usando um micrótomo ou vibrótomo, caso seções mais espessas (até 1 mm) sejam necessárias. Membranas de material polimérico foram então esterilizadas usando etanol absoluto, hidratado por meio de uma série de soluções de etanol graduadas e subseqüentemente lavadas (x3) com salina tamponada de fosfato (PBS) estéril antes do uso. Membranas podem ser montadas diretamente na base dos artigos de plástico de cultura celular já existentes (por exemplo, placa de 6 poços) ou aderidas a um suplemento de poço de cultura celular (ver figuras 12 e 13).

25 Microscopia eletrônica por varredura

As morfologias dos materiais foram investigadas usando um FBI XL30 ESEM que opera entre 20-25 kV. Segmentos fraturados foram montados em almofadas de fibra de carbono e anexados a pontas de alumínio e foram revestidas com ouro usando um borrifador de água Edwards Pirani

501. O cálculo do tamanho de lacuna médio foi realizado usando o software de análise de imagem Image J (NIH image). Diâmetros médios medidos desta maneira são subestimados dos valores reais. Desta forma, é necessário introduzir uma correção estatística. Isto é alcançado avaliando a média da razão R/r , onde R é o valor equatorial do diâmetro da lacuna e r é o valor do diâmetro medido a partir da micrografia. O fator estatístico é calculado a partir da eq. (1).

$$h^2 = R^2 - r^2 \quad (1)$$

10 A probabilidade de que o seccionamento aconteça em qualquer distância (h) do centro é a mesma para todos os valores de h , então o valor de probabilidade médio de h é $R/2$. Substituindo este valor na eq. (1) dá $R/r = 2/(3^{1/2})$. A multiplicação do valor médio observado do diâmetro da lacuna permite que um valor mais exato seja obtido.

Porosimetria de Intrusão de Mercúrio

15 Análise de porosimetria de intrusão de mercúrio foi realizada usando um Micromeritics AutoPoreIII 9420. Ângulos de contato de intrusão de extrusão de mercúrio de 130° foram usados. Penetrômetros com um volume de tronco de 1,836 mL e um volume de bulbo de 5 mL foram usados. O volume de intrusão sempre compreendeu entre 45 e 80% do volume de 20 tronco. Pressões de intrusão para os PoliHIPEs nunca excederam 200 psi (1,38 MPa).

Experimentos de Difusão por RMN 1H

25 O coeficiente de autodifusão de água (D_w) foi medido usando um espectrômetro de diâmetro interno estreito 500 *MHz* Varian Unity Inova 500 equipado com um amplificador de pulso de gradiente Performa II e uma sonda de direção indireta de 5 mm protegida ativamente. Iluminação com gradiente z automatizada a base de ecos de spin de deutério foi usada. A temperatura usada para todas as medições foi $25 +/- 0,1^\circ\text{C}$. Coeficientes de difusão de água foram medidos usando uma seqüência de pulso que incorpora

gradientes de campo pulsado, tal como a seqüência de pulso de eco estimulado por par de pulso bipolar (BPPSTE). Coeficientes de difusão são obtidos a partir de espectros BPPTSE monitorando a atenuação do sinal como uma função da amplitude do campo magnético aplicado e ajustando a eq. (2) 5 para os resultados experimentais.

$$I = I_0 \exp[-D(\gamma\delta G)^2(\Delta - (\delta/2) - (\tau/3))] \quad (2)$$

Na eq. (2), I é a intensidade de ressonância medida para uma dada amplitude de gradiente, G, I_0 é a intensidade na ausência do pulso gradiente, γ é a razão giromagnética, δ é a duração do par de pulso gradiente bipolar, Δ é o tempo de atraso de difusão e τ é um tempo de atraso de 10 recuperação de gradiente curto durante o qual o relaxamento e a evolução do acoplamento spin-spin não são significativos.

Cultura celular de hepatócito

A linha celular de carcinoma hepático humano, HepG2, foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC). Células HepG2 foram 15 cultivadas a 37°C em 5% de CO₂ em meio de crescimento (meio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM, Gibco/BRL) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de bezerro (FBS, Gibco/BRL), 100 μmL^{-1} de penicilina e 20 10 μmL^{-1} de estreptomicina (GibcoBRL)). Células foram passadas a cada 5-7 dias. Culturas de células confluentes foram lavadas com PBS, desanexadas usando solução tripsina/EDTA e o número de célula determinado usando um 25 hemocitômetro. Suspensões de células HepG2 foram então semeadas em densidades iguais tanto diretamente em poços de uma placa padrão de 6 poços (Nunc) quanto em suplementos de poço modificados montados com o polímero e localizados em poços de uma placa de 6 poços. Culturas foram mantidas em meio de crescimento que foi mudado a cada 3-4 dias ou conforme necessário.

Determinação do número de células viáveis

O número de células viáveis foi determinado usando um

ensaio colorimétrico comercialmente disponível (Promega) com base no método original de Mosrann para medição da atividade celular envolvendo a conversão de um sal de tetrazólio em um produto de formazan azul detectável por um espectrofotômetro (570 nm) [32]. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante em células HepG2 cultivadas em substratos 2-D e 3-D por vários períodos em condições de crescimento alternativas.

Estudos de toxicidade de metotrexato (MTX)

Células foram semeadas em superfícies 2-D e 3-D em triplicata e deixadas assentar e aderir por 24 horas. O meio foi então alterado e substituído por meio contendo diferentes concentrações de MTX (nenhum MTX (veículo somente, controle), 8 μ M, 31 μ M e 125 μ M. Células foram subseqüentemente incubadas por 1, 3, 7 ou 10 dias, depois dos quais culturas foram amostradas e ensaiadas para disponibilidade/número de célula e níveis de albumina e transglutaminase foram determinados.

Atividade metabólica do hepatócito

A produção de albumina é freqüentemente usada como um indicador da atividade metabólica do hepatócito. Níveis de albumina foram determinados usando um estojo comercialmente disponível (Bioassay systems) com base em um método estabelecido que utiliza verde de bromocresol que forma um complexo colorido especificamente com albumina que é detectável a 620 nm. Quantidades conhecidas de albumina humana foram usadas para estabelecer a curva padrão. Níveis específicos de secreção de albumina foram normalizados para níveis de proteína total (da forma determinada por um ensaio Bradford padrão).

Preparação de amostras para microscopia de elétron de varredura (SEM) e microscopia de elétron de transmissão (TEM)

Na preparação para SEM, células crescidas em substratos 2-D ou 3-D foram fixadas em 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão de fosfato de Sorenson por 1 hora a temperatura ambiente. Amostras

foram então rinsadas em 0,1 M de tampão fosfato e imersas em 1% de solução de OsO₄ (aq.) por 1 hora, então desidratadas em 50%, 70%, 95% e 100% de etanol por 5 minutos, quatro vezes para cada mudança de etanol respectiva. Amostras de culturas 2-D e 3-D fixadas foram então cortadas em pedaços menores (aproximadamente 25 mm²), montadas em suportes de corpos de prova e secas a partir de CO₂ a 38°C a 1.200 psi (8,3 MPa). As amostras foram então revestidas com borrifação com uma camada de 7 nm de cromo e examinadas usando um SEM Hitachi S5200.

Para análises TEM, células crescidas em substratos 3-D foram fixadas e tratadas da forma descrita anteriormente para SEM. Entretanto, subseqüente à desidratação e sendo cortadas em pedaços pequenos, amostras foram implantadas em resina (Araldite CY212, Agar Scientific) por 1 hora a 37°C e então colocadas em moldes piramidais a 60°C durante toda a noite. Para a preparação células crescidas em superfícies 2-D, culturas foram fixadas em 2% de paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído em tampão fosfato de Sorenson por 1 hora a temperatura ambiente. Células foram então descartadas do plástico de cultura de tecido e precipitadas a 15.000 rpm por 10 minutos. Células precipitadas foram subseqüentemente rinsadas em 0,1 M de tampão fosfato e imersas em 1% de solução OsO₄ (aq.) por 1 hora, então desidratadas em 50%, 70%, 95% e 100% de etanol por 5 minutos, quatro vezes para cada mudança respectiva de etanol. Os precipitados celulares desidratados foram então encharcados na resina (Araldite CY212) por 60 minutos a 37°C. Quando fixadas, seções ultra finas do material implantado na resina foram produzidas e subseqüentemente imageadas por TEM (Hitachi H7600).

25 *Ensaio enzimático de transglutaminase*

Transglutaminase do tecido é uma enzima de reticulação que recentemente sugeriu-se exercer um papel na formação de lesões fibróticas em montagens experimentais. O vazamento desta enzima é freqüentemente usado como um marcador para teste de toxicidade *in vitro* e sua presença

indica dano nas membranas celulares. Vários sistemas de modelo experimental *in vivo* e *in vitro* mostram uma relação direta entre a expressão e atividade de transglutaminase de tecido, supressão de crescimento celular e morte celular programada [33-35]. O nível de transglutaminase foi analisado 5 por meio de um ensaio enzimático quantitativo (Sigma, UK) da forma previamente descrita [36].

Análise estatística

Experimentos foram realizados como pelo menos três replicatas independentes. Dados foram analisados para significância 10 estatística usando o teste U de Mazur Whitney (em 5% de nível de significância ou mais).

EXEMPLO 1

Efeito da temperatura da fase aquosa

Observou-se que o aumento da temperatura da fase aquosa 15 causa um surpreendente aumento no médio quanto no diâmetro de lacuna médio do material PoliHIPE (Figura 2). Diâmetros de lacuna médios foram calculados a partir de um conjunto de 50 lacunas, os diâmetros dos quais foram determinados por análise de imageamento das micrografias SEM. Os valores de diâmetro de lacuna médios calculados ($\langle D \rangle$) mostram um aumento 20 da estabilidade com aumento da temperatura da fase aquosa (Tabela 1), que é mais provável em virtude da diminuição da estabilidade HIPE, uma vez que a temperatura da fase aquosa é aumentada. O aumento da temperatura da fase aquosa e, desta forma, agitação térmica das gotículas de água, aumentará a freqüência de contato e resultará em uma maior probabilidade de coalescência 25 das gotículas². Lissant também reportou que, uma vez que a emulsão é submetida ao aquecimento, o agente tensoativo na película interfacial que separa as gotículas se torna mais solúvel na fase líquida de massa e, desta forma, migra da interface³. Isto aumentará a tensão interfacial e assim promove a coalescência da gotícula. Também é notório que, à medida que a

temperatura da fase aquosa é aumenta, a viscosidade do HIPE diminui, sugerindo que as gotículas têm uma maior mobilidade. Isto também ajuda a promover coalescência.

Descreveu-se na literatura⁴ que a distribuição do tamanho da gotícula para uma emulsão que se submete a coalescência contém a presença de uma cauda que se estende em direção aos maiores tamanhos de gotícula, com o máximo ficando relativamente inalterado. O gráfico de distribuição do tamanho da lacuna (Figura 3) mostra a distribuição da cauda em direção aos maiores tamanhos de lacuna. A cauda aumenta com a temperatura e uma amplificação aumentada da distribuição também é observada. Isto, desta forma, reforça a opinião de que a coalescência é o principal mecanismo de instabilidade da emulsão à medida que a temperatura da fase aquosa é aumentada.

O gráfico diferencial de intrusão versus diâmetro da interconexão (Figura 4) mostra um aumento no tamanho interconexão a medida que a temperatura da fase aquosa aumenta. O gráfico também mostra que, à medida que a temperatura da fase aquosa aumenta, um material com uma distribuição mais estreita em diâmetros dos interconexões maiores e uma cauda que se estende na faixa de diâmetro da interconexão inferior existe. Isto sugere que, para cada emulsão, um diâmetro da interconexão limitante existe. Isto é o contrário da distribuição do tamanho da lacuna, onde uma distribuição mais ampla é obtida à medida que a temperatura aumenta. A razão dos diâmetros dos interconexões ($\langle d \rangle$) e de lacuna ($\langle D \rangle$) médio fornece uma medida do grau de interconexão. Os valores para os materiais preparados neste estudo são mostrados na tabela 1. À medida que a temperatura aumenta, o grau de interconexão ($\langle d \rangle / \langle D \rangle$) do material PoliHIPE diminui. Isto sugere que, à medida que a temperatura da fase aquosa aumenta, a estabilidade da emulsão diminui.

EXEMPLO 2

Efeito dos aditivos

A desestabilização parcial da emulsão pode ser induzida pela

presença de aditivos orgânicos na fase aquosa. Estes aditivos devem ser parcialmente solúveis tanto na fase contínua quanto interna da emulsão, que pode assim melhorar difusão de moléculas de água de gotícula a gotícula e promover envelhecimento de Ostwald. Lissant reportou³ que a adição de co-solventes, tais como acetona ou metanol, pode romper a película interfacial em virtude de sua solubilidade em ambas as fases. Estes aditivos podem diluir a camada interfacial e fazer com que alguns dos agentes tensoativos migrem na fase de volume, promovendo assim coalescência das gotículas da emulsão.

Poli(etileno glicol) de $M_n=300$ (PEG300), metanol e tetraidrofurano (THF) foram escolhidos como espécies orgânicas miscíveis em água, com uma vista para selecionar espécies com uma faixa de massas molares e de diferentes polaridades. Cada componente foi adicionado aos HIPEs em quantidades crescentes até que a separação de fases ocorresse. Observou-se que a emulsão poderia aceitar quantidades muito maiores de metanol que tanto THF quanto PEG, e isto é particularmente aparente se considera-se as quantidades molares de cada um deles (0,1 mol de metanol, 0,02 mol de THF e 0,005 mol de PEG). Isto se dá em virtude do maior divisão de metanol na fase aquosa, pelo menos em comparação com THF. O valor do coeficiente de partição de octanol/água (log Pow) para THF é 0,45, enquanto que o do metanol é – 0,77. Nenhum valor de log Pow pôde ser encontrado para PEG. As imagens SEM (Figura 5) sugerem que cada aditivo produz um aumento no tamanho de lacuna e interconexão médio. Análise de imagem das micrografias SEM produz as distribuições de tamanho de lacuna, que são apresentadas na figura 6. A figura 6a mostra que a adição de PEG produz um material com uma distribuição mais ampla de tamanhos de lacuna que o material PoliHIPE sem nenhum aditivo presente, com uma cauda que se estende no sentido dos tamanhos de lacuna maiores. Este padrão é similar ao obtido para metanol (figura 6b) e THF (figura 6c), entretanto com metanol o efeito na distribuição é menor que para THF ou PEG. Os materiais preparados

com THF ou PEG contêm uma faixa mais ampla de tamanhos de lacuna que os materiais preparados com metanol. PEG e THF também produziram materiais PoliHIPE com valores de tamanho de lacuna médio maiores (ver tabela 1).

As curvas de distribuição de interconexão são similares na natureza para todos os aditivos usados (Figura 7). À medida que a concentração de aditivo aumenta, existe uma tendência no sentido de materiais com um diâmetro da interconexão médio maior e uma distribuição de um tamanho mais estreito. A exceção para esta tendência é quando THF é usado como o aditivo. Neste caso, uma ampla distribuição ainda é contida em alta concentração de THF. Quando PEG foi usado como o aditivo, os valores de diâmetro da interconexão médio aumentaram estavelmente com a concentração de PEG na fase aquosa (Tabela 1). Este efeito não foi tão pronunciado para THF ou metanol; para estes aditivos, concentrações muito maiores foram necessárias para produzir uma mudança significativa no diâmetro da interconexão. No caso de THF, isto foi inesperado, uma vez que ele tinha o efeito mais significativo no diâmetro de lacuna médio. O grau de interconexão ($\langle d \rangle / \langle D \rangle$) diminui depois da adição inicial do componente orgânico, que realizada pelo grande aumento no diâmetro de lacuna comparado ao diâmetro da interconexão. Depois da adição inicial de PEG ou metanol, o grau de interconexão aumenta estavelmente com a concentração na fase aquosa. Entretanto, no caso de THF, o grau de interconexão continuou a diminuir com o aumento da concentração. Isto se dá em virtude de o THF não ter nenhum efeito significativo no tamanho da interconexão até que a concentração alcance 1,5%.

Em trabalhos anteriores⁵ o aumento no tamanho da lacuna de materiais PoliHIPE na adição de um co-solvente ou aditivo foi descrito somente para envelhecimento de Ostwald. Entretanto, é possível que aditivos orgânicos influenciem outros processos que levam à desestabilização da

emulsão. Da forma discutida anteriormente, a adição de um co-solvente pode romper a camada interfacial fazendo com que o agente tensoativo migre na fase de volume, fazendo com que as gotículas de emulsão se tornem mais propensas à coalescência. É possível que a taxa tanto de coalescência quanto de envelhecimento de Ostwald sejam melhoradas pela adição de co-solventes ao sistema e que um processo pode dominar dependendo do sistema exato (tipo de emulsão, tipo de agente tensoativo, etc.).

De maneira a provar a influência de envelhecimento de Ostwald, o coeficiente de autodifusão de água, D_w , foi monitorado na presença de cada aditivo durante um período de 8 horas (Tabela 2). Quando o metanol está presente, não existe nenhuma diferença significativa no coeficiente de difusão comparado à emulsão sem nenhum aditivo presente. Quando o PEG e THF são usados, existe um efeito significativo no coeficiente de difusão com um maior efeito observado para THF. Estes valores podem ser correlacionados com os diâmetros de lacuna e interconexão médios obtidos.

A alteração no coeficiente de difusão de água com o tempo (ΔD_w) pode dar um discernimento possível no efeito de cada co-solvente na emulsão (Figura 8). Na presença de THF e PEG, existe um maior aumento em D_w comparado à emulsão sem nenhum co-solvente presente. Isto sugere que tanto THF quanto PEG melhoram a taxa de difusão da água na emulsão, que aumentaria o envelhecimento de Ostwald e é uma possível explicação para o aumento no tamanho da lacuna. O valor do coeficiente de partição octanol/água ($\log P_{ow}$) para os aditivos = 0,45; metanol = - 0,77) indica que THF divide mais na fase de óleo que metanol, resultando em uma emulsão menos estável na presença de THF.

Uma vez que não houve nenhum aumento significativo em D , na presença de metanol, outros efeitos, tal como coalescência devem ser considerados para explicar o aumento observado no diâmetro de lacuna.

Coalescência pode ser promovida por diluição da camada interfacial e subsequente migração do agente tensoativo na fase de volume em virtude de sua maior solubilidade na presença do co-solvente. Se este for o caso, a concentração de agente tensoativo (C_s) deve ter um efeito na morfologia final do material.

Para investigar a influência de C_s na morfologia, materiais PoliHIPE com diferentes valores de C_s foram preparados usando THF e metanol como aditivos. Uma vez que THF mostrou melhorar a difusão em água, isto permitiria investigar se a morfologia obtida com THF foi somente em virtude do envelhecimento de Ostwald ou se a depleção do agente tensoativo da interface também esteve envolvida. Metanol, por outro lado, não mostrou ter nenhuma influência na taxa de difusão da água. Desta forma, esperou-se que um aumento em C_s teria um efeito profundo na morfologia se metanol influenciasse a concentração de agente tensoativo na interface. Pôde-se observar a partir das imagens SEM (Figura 9a, b) que, à medida que a concentração de agente tensoativo em HIPEs contendo THF aumenta, há um aumento na natureza aberta do material, mas nenhum efeito discernível real no diâmetro de lacuna. A partir do gráfico de distribuição de lacuna, entretanto, existe uma pequena substituição para diâmetro de lacuna inferior com aumento da concentração de agente tensoativo (Figura 10a). Entretanto, nenhum achatamento ou amplificação da distribuição é observado com a diminuição da concentração de agente tensoativo.

Com THF como aditivo, o valor de $\langle d \rangle / \langle D \rangle$ (Tabela 3) aumenta à medida que a concentração de agente tensoativo aumenta. Isto se dá em virtude de uma ligeira redução em $\langle D \rangle$ com pouco efeito em $\langle d \rangle$ e fornece evidência adicional que, à medida que a concentração de agente tensoativo aumenta na presença do THF, a natureza aberta do material aumenta. Entretanto, embora exista uma ligeira diminuição no tamanho da lacuna médio com o aumento da concentração de agente tensoativo, ainda

existe um aumento significativo em $\langle D \rangle$ relativo ao material preparado sem nenhum aditivo presente (comparar entrada 3 na tabela 3 com entrada 1 na tabela 1). Isto sugere que envelhecimento de Ostwald é o efeito dominante na determinação da morfologia de materiais PoliHIPE a base de poliestireno 5 preparados na presença de THF.

A concentração de agente tensoativo também foi maior na presença de metanol na fase aquosa. Isto teve pouco efeito na morfologia dos materiais resultantes (Figura 9o, d). A partir dos gráficos de distribuição do tamanho da lacuna (Figura 1b) existe pouca diferença na distribuição quando 10 a concentração de agente tensoativo é aumentada de 20 a 30% p/p. O único efeito discernível ocorre quando a concentração de agente tensoativo aumentou para 30% p/p, na qual existe um pequeno aumento na percentagem de lacunas presentes com um diâmetro entre 30 e 40 μm e uma diminuição na percentagem de lacunas presentes em diâmetros maiores. Entretanto, a tabela 15 3 indica que um valor máximo de $\langle D \rangle$ é obtido quanto $C_s = 25\%$.

A concentração de agente tensoativo tem pouco efeito no diâmetro da interconexão quando THF é usado como o aditivo (Figura 11a). Ao contrário, o aumento da concentração de agente tensoativo de 20 para 25% p/p resulta em um deslocamento do pico no sentido de diâmetros das 20 interconexões maiores (Figura 11b) na presença de metanol. Entretanto, quando a concentração de agente tensoativo é aumentada de 25% para 30% p/p diâmetros das interconexões menores são obtidos, embora as razões $\langle d \rangle / \langle D \rangle$ (Tabela 3) para ambos os materiais sejam similares, uma vez que esta também é acompanhada por uma diminuição em $\langle D \rangle$.

25 A partir destes resultados, conclui-se que o envelhecimento de Ostwald não é a causa do maior diâmetro de lacuna na presença de metanol, uma vez que este aditivo não teve nenhuma influência na taxa de autodifusão da água. Um outro processo pelo qual a água pode ser transportada de gotícula a gotícula é no interior de micelas a/o⁶, que sabe-se que estão

presentes na fase contínua de HIPEs⁷. Um aumento na concentração de agente tensoativo aumentaria o número de micelas na fase contínua, que melhoraria o transporte de água entre gotículas. Para explicar os resultados obtidos com metanol quando a concentração de agente tensoativo aumenta, conclui-se que 5 o agente tensoativo adicionado influencia dois processos opostos: ele substitui o agente tensoativo esgotado por metanol, que estabiliza a emulsão; e ele também aumenta o número de micelas a/o, melhorando o transporte de água e desestabilizando a emulsão. O suporte para isto vem dos valores máximos observados de $\langle D \rangle$ e $\langle d \rangle$ a $C_s = 25\%$, sugerindo que dois processos 10 independentes estão operando. O efeito em rede é que existe pouca mudança observada na morfologia de PoliHIPEs preparados com metanol quando o teor de agente tensoativo aumenta de 20 a 30% (p/p).

Em conclusão, mostrou-se que diferentes métodos podem ser usados para controlar a estabilidade da emulsão para produzir materiais 15 PoliHIPE com uma ampla faixa de tamanhos de lacuna e interconexão. O controle destes parâmetros permitirá a produção de diferentes estruturas andaime, cada uma ajustada e adequada para uso na cultura 3D de diferentes tipos de célula.

EXEMPLO 3

20 A capacidade de controlar a estrutura de materiais PoliHIPE é crítica para garantir o crescimento ideal de células cultivadas de uma maneira de 3 dimensões. Desenvolveu-se uma aplicação inédita destes materiais para este propósito modificando por engenharia andaimes poliméricos a base de estireno em membranas finas adequadas para crescimento celular de rotina *in* 25 *vitro* adaptando seu uso ao artigo de plástico de cultura de tecido já existente (ver exemplos: Figuras 12 e 13). A abordagem para usar camadas finas com grandes áreas superficiais permite: (1) Bom acesso das células na estrutura do material por semeadura tanto estática quanto dinâmica; permite bom acesso de oxigênio e nutrientes (em alguns casos de ambos os lados da membrana –

ver figura 12, exemplo 1) e remoção de materiais de resíduo e dióxido de carbono, minimizando assim a chance de ocorrência de necrose, da maneira encontrada em andaimes de polímero de maiores dimensões. Estes atributos promovem a viabilidade das células cultivadas em 3 dimensões; (2) Bom 5 acesso por reagentes exógenos (por exemplo, compostos de teste) a células em crescimento em 3-dimensões; (3) Células a ser removidas de andaime depois de crescimento celular em 3 dimensões para análise adicional usando tratamentos enzimáticos, tal como incubação com tripsina (dados não 10 apresentados); (4) Células e tecidos que crescem no andaime podem ser visualizadas usando microscopia eletrônica ou ótica (Figuras 14 e 20, 15 respectivamente).

A capacidade de controlar as dimensões que constituem a estrutura do material polimérico é essencial para otimização do crescimento e conduta celular. Diferenças sutis na porosidade destes materiais têm 20 implicações significativas na capacidade das células de aderirem ao andaime, proliferar, diferenciar e funcionar (Figuras 15-17). Materiais poliméricos a base de estireno produzidos com 90% de volume do poro e otimizados para crescimento celular *in vitro* também melhoraram a proliferação, diferenciação e função celular comparados ao artigo de plástico de cultura celular de 2 dimensões convencional (Figuras 18-24).

EXEMPLO 4

Características morfológicas de célula HepG2 crescidas em substratos alternativos:

Microscopia de elétron de varredura revelou diferenças 25 significativas na aparência de células HepG2 cultivadas em substratos tanto 2-D quanto 3-D (Figura 25). Células crescidas em superfícies planares 2-D formaram estruturas estendidas retas depois de 7 dias. Em geral, culturas 2-D pareceram heterogêneas e desorganizadas. Depois de 14 dias, células cultivadas em plástico de cultura de tecido começaram a agrupar e formar

agregados. Em algumas áreas de culturas 2-D crescidas por 14-21 dias, células HepG2 pareceram não saudáveis, algumas foram reunidas e outras foram desintegridas (dados não apresentados). Células cultivadas em poliestireno 3-D, espalharam ao longo e na estrutura do andaime. Células 5 inicialmente agruparam em colônias de células intimamente empacotadas na substância do polímero, parecendo-se a pequenos agregados multicelulares. Isto foi indicativo da maior anexação e interação entre células adjacentes que crescem no andaime. Depois de 7 dias, culturas de células HepG2 crescidas em 10 3-D pareceram mais homogêneas que sua cópia em 2-D. Culturas que crescem que densidades de semeadura menores mostraram as células anexadas ao andaime e estendidas ao longo das lacunas. Isto demonstrou como o crescimento celular em 3-D pode maximizar sua área superficial interagindo com células adjacentes e o meio de incubação. Além do mais, 15 imageamento de amplificação maior de células individuais crescidas em 3-D revelou um número significativamente maior de micro-villi comparado a células crescidas em superfícies 2-D.

Microscopia de elétron de transmissão foi usada para examinar as características estruturais de células HepG2 cultivadas em diferentes materiais (Figura 26). No geral, a análise de células inteiras intactas crescidas 20 em substratos tanto 2-D quanto 3-D continha uma faixa de organelas típica da maioria das células de mamífero, incluindo mitocôndria, núcleo, retículo endoplasmático e gotículas de lipídeo. Seções ultra finas de preparações de célula crescidas em 3-D mostraram claramente como as células crescem em torno e em associação íntima com o andaime de poliestireno. Células 25 cultivadas nas superfícies 3-D apresentaram inúmeras características morfológicas típicas do tecido hepático. Membranas nucleares pareceram ser normais. Inúmeras mitocôndrias visualizadas apresentaram variâncias estruturais na faixa normal. Nenhuma alteração patológica específica foi detectável no retículo endoplasmático tanto liso quanto rugoso, nos

complexos de Golgi, ou no teor de glicogênio. A presença destas características ultra-estruturais indicou que células HepG2 crescidas em substratos 3-D foram metabolicamente ativas. A presença de agregados peroxissomais (Figura 26B), que são organelas celulares ubíquitas abundantes no fígado e rins de mamíferos, foi particularmente encorajador. Sabe-se que proxissomas hepáticos são responsáveis pela β -oxidação da cadeia lateral do colesterol no curso da síntese de ácido biliar, um caminho associado a hepatócitos diferenciados [8].

No tecido hepático nativo, hepatócitos possuem polaridade com duas ou três superfícies basais revestindo o sinusóide, enquanto que células adjacentes formam o cálculo biliar. Micrografias de células crescidas em 3-D revelaram que hepatócitos adjacentes freqüentemente compartilharam canais alinhados com micro-villi alinhados com junções estreitas. Esta observação sugere que células HepG2 cultivadas podem ser polarizadas e capazes de formar canais que se parecem cálculos biliares [9]. Sabe-se que estas estruturas são ricas em micro-villi e componentes da bile metabolizados nas células são normalmente secretados nos cálculos.

EXEMPLO 5

Melhor viabilidade da célula durante crescimento celular em 3-D:

Examinou-se se as superfícies usadas neste estudo foram biocompatíveis com o suporte de crescimento de células HepG2 viáveis. A figura 27A ilustra os valores de absorbância Mn para hepatócitos crescidos em superfícies 2-D controle e nos andaimes 3-D. As células viáveis foram sucessivamente cultivadas em ambos os substratos por até 21 dias. O ensaio revelou que a viabilidade da célula foi significativamente melhor quando crescida em 3-D. Observou-se que células crescidas em andaimes têm maior área superficial à qual se anexam e crescem, comparada às superfícies planares, onde o espaço por célula é restrito. Onde possível, esta diferença foi considerada e valores foram normalizados para ensaios *in vitro*.

EXEMPLO 6

Melhor metabolismo celular durante crescimento celular em 3-D:

A atividade metabólica de células HepG2 foi estimada determinando o nível de secreção de albumina. A figura 27B mostra os cursos de tempo de secreção de albumina em plástico de cultura de tecido 2-D e os andaimes 3-D. Valores foram normalizados para considerar qualquer diferença no número de célula. Pode-se claramente ver que existe uma concentração significativamente maior de albumina em culturas crescidas em superfícies 3-D comparado ao crescimento celular em 2-D para todos os pontos de tempo que foram testados. Os níveis de albumina em culturas crescidas em plástico de cultura de tecido reto atingiram o pico no dia 14 e então diminuíram rapidamente em 21 dias. Isto não ocorre em culturas crescidas em andaimes 3-D indicando que o ambiente 3-D é mais condutivo para função celular.

15 **EXEMPLO 7**

Efeitos do metotrexato no crescimento celular em 2-D e 3-D:

Células HepG2 crescidas em formatos 2-D e 3-D foram tratadas com várias concentrações de MTX para avaliar sua tolerância a uma citotoxina bem conhecida. depois de cada período de tratamento, culturas 20 foram então estudadas para mudanças bioquímicas (Figura 28) e morfológicas (Figura 29 & 30).

A figura 28A ilustra a viabilidade da célula depois de 1 e 7 dias tratadas com concentrações variadas de MTX. O tratamento de monocamadas de HepG2 com MTX resultou em um aumento gradual da absorbância a 15 μ M de MTX depois de 24 horas, mas os níveis de absorbância começaram a cair a 7 dias (dados não mostrados). Com o aumento nas concentrações de MTX, a viabilidade do crescimento celular em superfícies 2-D foi visivelmente reduzida, especialmente nos níveis mais elevados da citotoxina. Em culturas 3-D, a sensibilidade ao MTX não foi

evidente nas concentrações inferiores de MTX; somente a 62 μ M de MTX houve uma diminuição significativa nos níveis de absorbância comparados aos valores de controle. Este padrão também foi visto em culturas 3-D crescidas por 7 dias, enquanto que o crescimento celular em monocamadas por 7 dias mostrou uma clara diminuição nos níveis de absorbância em concentrações de 125 μ M de MTX. Estes resultados implicam que células cultivadas em superfícies 2-D nestas condições permanecem viáveis por um período menos comparado às células cultivadas em andaimes 3-D.

A atividade metabólica das células HepG2 foi significativamente reduzida aumentando as concentrações de MTX (Figura 28B). Células crescidas em 2-D foram sensíveis às menores concentrações de MTX testadas (8 μ M), enquanto que este nível não influenciou significativamente a secreção de albumina pelas células crescidas em 3-D (dados não apresentados). Entretanto, maiores níveis de MTX (15,6 μ M) realmente começaram a reduzir a secreção de albumina pelas células cultivadas em andaimes. Durante todo o desafio citotóxico, níveis mais altos de secreção de albumina foram observados nas células crescidas em plástico 3-D comparado aos 2 materiais -D. Estes dados ilustram que a função da célula do hepatócito foi desemparelhada na presença de MTX de uma maneira dependente da dose e células crescidas em 3-D pareceram mais tolerantes à citotoxina.

A medição de transglutaminase foi realizada como um teste para toxicidade de célula HepG2 em resposta às concentrações crescentes de MTX. Foram examinados os efeitos de MTX nos níveis de transglutaminase em culturas 2-D e 3-D depois de 1, 7 e 10 dias de exposição à citotoxina. (Figura 28C). Em culturas de controle, onde não houve nenhuma adição de MTX, observou-se que níveis de transglutaminase foram mínimos e em níveis similares. Com concentrações crescentes do medicamento, tal como 31 μ M de MTX, culturas 2D secretaram níveis significativamente maiores de

transglutaminase que aumentou de uma maneira dependente da dose, ao contrário de células crescidas em cultura 3-D. Estas diferenças foram estatisticamente significativas em todas as culturas 2-D em 7 e 10 dias, comparado às cópias em 3-D. Em culturas 3-D, o aumento da concentração de

5 MTX não causou um aumento significativo nos níveis de transglutaminase, embora houvesse um aumento gradual nos níveis enzimáticos secretados no meio de cultura em concentrações maiores do medicamento. Estes dados adicionalmente sugerem que células em materiais porosos 3D são mais tolerantes aos níveis crescentes de desafio de citotoxina.

10 Micrografias eletrônicas de varredura (SEM) e de transmissão (TEM) demonstraram mudanças dependentes da concentração na estrutura da célula subseqüente ao tratamento com MTX. Exemplos representativos de tais mudanças morfológicas são ilustrados na figuras 29 e 30. Células HepG2 saudáveis normais expressam inúmeros micro-villi na sua superfície celular.

15 Quando desafiadas com MTX, células crescidas em superfícies 2-D gradualmente perdem seu micro-villi de uma maneira dependente da dose, enquanto que células crescidas em andaimes continuam a expressar esta característica estrutural (Figura 29). Em resposta aos níveis crescentes de MTX, a superfície de células HepG2 crescidas como monocamadas, primeiramente diminuiu o número de micro-villi, então se tornou achatada, e então começou a desintegrar. Nenhuma de tais mudanças foi observada na estrutura de células HepG2 crescidas em andaimes 3-D, embora o micro-villi de células crescidas na maior concentração de MTX testada (125 μ M) não mostrasse sinais de achatamento.

20 25 Exame adicional por TEM revelou mudanças ultra-estruturais nas células desafiadas pela citotoxina (Figura 30). Células crescidas em superfícies 2-D possuíam morfologia saudável com núcleo proeminente com nucléolos visíveis em culturas de controle. Depois do tratamento com 8 μ M de MTX, células com boa arquitetura nuclear permaneceram visíveis em

culturas 2-D, embora áreas de necrose celular também tenham sido evidentes. Culturas 2-D de hepatócitos tratadas com níveis crescentes de MTX mostraram citotoxicidade acentuada e a maioria das células se tornou necrótica em altos níveis de MTX. Características, tais como de-granulação 5 do retículo endoplasmático e a presença de espectros ribossomais foram observadas. Além disso, o citoplasma granular que geralmente não tem uma estrutura organizada e grânulos cromáticos agrupados foi disperso em todo o núcleo. Evidência subcelular de apoptose também foi observada; a membrana plasmática foi vista romper e uma quantidade acentuada de formação de 10 vacúolo, possivelmente que reflete a presença de gotículas de lipídeo e degeneração celular. O encolhimento da célula também foi óbvio, bem como uma perda de contato de célula-para-célula depois da formação de corpos 15 apoptóticos (autofagolisossomas) e morte celular. Na concentração mais alta, “espectros” celulares remanescentes foram observados, indicando que as células crescidas em 2-D expostas a níveis mais altos de MTX tinham se 20 submetido a um estágio avançado de morte celular.

Ao contrário, células HepG2 crescidas em cultura 3-D e expostas ao MTX foram significativamente mais resistentes aos efeitos da citotoxina. A ultra-estrutura de células tratadas com concentrações inferiores 25 de MTX possuiu organelas normais no seu citoplasma (RER, ribossomas, mitocôndria e gotículas de lipídeo). O núcleo apresentou heterocromatina e nucléolo normais. Estas características foram bem preservadas durante toda a maioria das concentrações de MTX testadas. Entretanto, em algumas células na presença de 125 μ M de MTX, a membrana nuclear teve uma morfologia irregular e outras características sub-celulares, tal como mitocôndria, que pareceu ser ligeiramente anormal. É provável, desta forma, que em maiores concentrações de MTX, células em culturas 3-D começam a se submeter a mudanças similares às experimentadas pelas células cultivadas em 2-D, conforme visto em concentrações significativamente menores da citotoxina.

Em resumo, o crescimento de células em andaimes poliméricos a base de estireno adaptados para uso em artigo de plástico de cultura célula já existente fornece a oportunidade de crescimento celular em 3 dimensões *in vitro*. A conduta da célula é influenciada pelo ambiente em que 5 o crescimento celular e as células crescidas em 3-dimensões é mais realístico e se parece mais intimamente as condições de crescimento celular normalmente experimentadas no corpo. O aparelho aqui descrito fornece uma oportunidade para pesquisadores de rotineiramente crescer células em 3- dimensões que serão invalidadas para leituras mais exatas de modelos e 10 ensaios celulares. O aparelho também é inerte, fácil de usar, pode ser esterilizado, é barato de fabricar e produzir, é robusto e reproduzível, tem uma meia vida de prateleira indefinida e é adaptável a muitas aplicações.

EXEMPLO 8

Em uma aplicação adicional para o uso do andaime de 15 poliestireno, desenvolveu-se um modelo organotípico de pele de mamífero consistindo em uma lâmina estratificada de queratinócito epidérmicos crescidos na interface mediana em uma camada de fibroblastos dérmicos na presença ou ausência de um revestimento de gel ou solução de colágeno no andaime. Este sistema possibilita o crescimento a longo prazo e manutenção 20 do epitélio polarizado que intimamente se parece com a pele nativa. A tecnologia pode ser usada para investigar a função das células epiteliais da pele em uma ampla faixa de aplicações, incluindo ciência básica, desenvolvimento de produtos farmacêuticos e estimativa da toxicidade do composto.

25 Modelos organotípicos para o crescimento de pele de mamífero são bem estabelecidos e inúmeros procedimentos foram desenvolvidos para alcançar isto *in vitro* (por exemplo: Bohnert et al. 1986; Ikuta et,al. 2006; Prunieras et al. 1983; Schoop et al. 1999). Os procedimentos já existentes requerem o crescimento de fibroblastos dérmicos em uma

5 mistura de gel de colágeno, mediante o qual queratinócitos são semeados em uma prensa de duas camadas. O gel encolhe com o tempo; ele é então aumentado para a interface ar/meio para possibilitar mudanças no crescimento e atividade celular. O manuseio do gel é difícil e requer tempo, conhecimento e concentração. Conseqüentemente, este modelo não é prontamente adaptável para estratégias de seleção de alto rendimento ou em circunstâncias onde uma redução na variabilidade é requerida e fácil manuseio é necessário.

10 Aqui, demonstrou-se a aplicação de andaime 3 D de poliestirenos para mais prontamente possibilitar o uso e manuseio de rotina de fibroblastos dérmicos e géis de colágeno para co-culturas de pele organotípica. Resumidamente, culturas de fibroblastos dérmicos são semeadas na superfície dos andaimes 3D de poliestireno em meio de crescimento apropriado (Figura 31a). As células crescem na superfície e na estrutura da membrana 3D (Figura 32). Isto pode ser alcançado na presença ou ausência 15 de uma solução/gel de colágeno ou pré-revestimento do andaime com solução de colágeno (por exemplo, colágeno tipo I). O andaime plástico 3D inerte fornece suporte para os fibroblastos cultivados. Os andaimes assentados com fibroblastos são prontamente manuseados e podem ser transferidos no artigo plástico de cultura celular recém preparado (por exemplo, placa de 6 poços), 20 se necessário. Além do mais, o encolhimento de um gel de colágeno molde é minimizado que reduz variabilidade entre os experimentos. Subseqüente ao estabelecimento da cultura do fibroblasto, uma co-cultura organotípica é estabelecida semeando queratinócito epidérmicos (por exemplo, células HaCaT) na superfície dos fibroblastos (Figura 31b). Quando a cultura de 25 queratinócito é estabelecida (~2 dias), a superfície do andaime de poliestireno é suspensa para a interface ar-líquido. A exposição ao ar induz a estratificação dos queratinócitos (Figuras 31c e 33).

As vantagens de usar os andaimes de poliestireno porosos 3 D para co-cultura organotípica de pele de mamífero são:

- Fornecer suporte para as células (e gel se apropriado) e ambiente 3D para a cultura de fibroblasto dérmico
- Possibilitar o fácil manuseio da mistura cultura de fibroblasto/ gel de colágeno e evitar a quebra ou dano dos géis/cultura
- 5 - Minimizar o encolhimento do gel de colágeno
- Possibilitar liberdade para rapidamente transferir culturas organotípicas para outros vasos
- Elevar a cultura para a interface ar/líquido tanto reduzindo o nível do meio quanto aumentando o andaime em si (por exemplo, usando a configuração de inserto de poço junto com adaptadores para aumentar a altura do inserto)

Referências

1. A. Barbetta e N. R. Cameron, *Macromolecules*, 2004, 37, 3158. 20
- 15 2. A. S. Kabalnov e E. G. Shchukin, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1992, 38, 69.
3. K. J. Lissant (ed.), 'Emulsions and Emulsion Technology Part 1', Marcel Dekker Inc., New York, 1974.
- 20 4. M. P. Aronson e M. F. Petko, *J. Colloid Interface Set*, 1993, 159, 134.
5. M. W. Hayman, K. H. Smith, N. R. Cameron, e S. A. Przyborski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 314, 483; M. W. Hayman, K. H. Smith, N. R. Cameron, e S. A. Przyborski, *J. Biochem. Biophys. Métodos*, 2005, 62, 231.
- 25 6. J. G. Weers, in 'Modern Aspects of Emulsion Science', ed. B. P. Binks, RSC, Cambridge, 1998.
7. J. C. Ravey e M. J. Stebe, *Frog. Colloid Polim. Sci.*, 1990, 82, 218; R. Pons, P. Erra, C. Solans, J. C. Ravey, e M. J. Stebe, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 12320; R. Pons, J. C. Ravey, S. Sauvage, M. J. Stebe, P.

Erra, e C. Solans, *Colloids Surf., A: Physicochem: Eng. Aspects*, 1993, 76, 171; J. C. Ravey, M. J. Stebe, e S. Sauvage, *Colloids Surf., A: Physicochein. Eng. Aspects*, 1994, 91, 237.

8. Beier K, Fahimi M. Application of automatic image analysis for quantitative morphological studies of peroxisomes in rat liver in conjunction with cytochemical staining with 3,3'-diaminobenzidine and immunocytochemistry. *Microsc Res Tech* 1992 Jun 1;21(4):271-282.

9. Abu-Absi SF, Friend JR, Hansen LK, Hu WS. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res* 2002 Mar 10;274(1):56-67.

10. Bohnert A, Hornung J, Mackenzie IC, Fusenig NE (1986). Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. *Cell Tissue Res* 244:413-429.

11. Ikuta S, Sekino N, Hara T, Saito Y, Chida K (2006). Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:2669-2675.

12. Prunieras M, Regnier M, Woodley D (1983). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 81:28s-33s.

13. Schoop Mirancea N, Fusenig NE (1999). Epidermal organisation and differentiation of HaCCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112:343-353.

Tabela 1

Temp,:1°C	Aditivo (%) ^b	$\langle d \rangle / \mu\text{m}^{\text{c}}$	$\langle d \rangle / \mu\text{m}^{\text{d}}$	$\langle d \rangle / \langle D \rangle$
23	-	35	11	0,29
50	-	74	18	0,27
60	-	94	19	0,22
80	-	104	26	0,25
23	PEG (0,2)	82	12	0,15
23	PEG (0,4)	73	14	0,19
23	PEG (0,8)	84	15	0,17
23	PEG (1,5)	74	16	0,22
23	MeOH (1,0)	59	12	0,20
23	MeOH (2,0)	57	12	0,21
23	MeOH (3,0)	68	16	0,24
23	MeOH (4,0)	65	14	0,22
23	THF (0,4)	60	12	0,20
23	THF (0,8)	90	12	0,13
23	O (1,0)	72	12	0,17
23	THF (1,5)	99	15	0,15

^a temperatura da fase aquosa

^b aditivo de fase aquosa expresso como% em vol (% p/vol para PEG)

^c diâmetro de lacuna médio determinado por SEM

^d diâmetro da interconexão médio determinado por porosimetria de mercúrio

Tabela 2

Aditivo (%) ^b	$\langle D \rangle / \mu\text{m}$	$\langle d \rangle / \mu\text{m}^{\text{d}}$	$(Dw/\text{m}^2) \times 10^{-10} \text{ e}$	$(Dw/\text{m}^2) \times 10^{-10} \text{ f}$	$(\Delta Dw/\text{m}^2) \times 10^{-10} \text{ g}$
	35	11	7,1	8,2	1,1
THi~ (1,5)	99	15	10,1	12,1	2
MeOH (2)	57	12,	7,3	8,1	0,8
PEG (1,5)	74	16	7,8	9,4	1,6

^a Em cada caso a fase aquosa foi mantida a temperatura ambiente durante o

preparo da emulsão.

^b aditivo da fase aquosa expresso como% (v/v) (% (p/v) para PEG)

^c diâmetro de lacuna médio determinado por SEM

^d diâmetro de lacuna médio determinado por porosimetria de Hg

5 ^e D_{wi} = valor inicial de coeficiente de autodifusão da água

^f D_{wf} = valor final de coeficiente de autodifusão da água

^g ΔD_w = mudança no coeficiente de autodifusão da água

Tabela 3

Aditivo'	Cs (% p/p) ^b	$\langle D \rangle / \mu\text{m}^{\text{c}}$	$\langle d \rangle / \mu\text{m}^{\text{d}}$	$\langle d \rangle / \langle D \rangle$
THF	20	74	12	0,16
THF	25	72	12	0,17
THF	30	66	14	0,22
MeOH	20	58	10	0,17
MeOH	25	65	15	0,23
MeOH	30	53	12	0,23

^a 1,5% (v/v) de THF, 4% (v/v) de metanol

10 ^b Concentração de agente tensoativo (Span 80) expressa como porcentagem de fase de monômero total

^c diâmetro de lacuna médio determinado por SEM

^d diâmetro da interconexão médio determinado por porosimetria de Hg.

REIVINDICAÇÕES

1. Substrato de cultura celular, caracterizado pelo fato de compreender uma pluralidade de material polimérico microcelular, em que o volume do poro do material polimérico microcelular está entre 88% e 92%.

5 2. Substrato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o volume do poro é de cerca de 90%.

3. Substrato de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito substrato compreende um elastômero hidrofóbico em uma concentração entre 20% (p/p) e 40% (p/p).

10 4. Substrato de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o dito elastômero hidrofóbico está em uma concentração entre 25% (p/p) e 35% (p/p).

15 5. Substrato de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que o dito elastômero hidrofóbico é fornecido em uma concentração de 30% (p/p).

6. Substrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo fato de que o dito elastômero é selecionado do grupo que consiste de: acrilato de 2-etilexila; acrilato de n-butila e acrilato de n-hexila.

20 7. Substrato de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito elastômero é acrilato de 2-etilexila.

8. Substrato de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que acrilato de 2-etilexila é fornecido entre 28% (p/p) e 32% (p/p).

25 9. Substrato de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que acrilato de 2-etilexila é fornecido a cerca de 30% (p/p).

10. Substrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o dito substrato de cultura celular compreende polivinila.

11. Substrato de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito polivinila é poliestireno.

12. Substrato de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o dito poliestireno compreende um monômero de estireno e 5 divinil benzeno.

13. Substrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o dito substrato de cultura celular compreende um agente tensoativo.

14. Substrato de acordo com a reivindicação 13, caracterizado 10 pelo fato de que o dito agente tensoativo é fornecido em uma concentração de 20-30% (p/p).

15. Substrato de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o dito agente tensoativo é fornecido em uma concentração entre 24-26% (p/p).

16. Substrato de acordo com a reivindicação 15, caracterizado 15 pelo fato de que o dito agente tensoativo é fornecido em uma concentração de cerca de 25% (p/p).

17. Substrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o dito substrato de cultura celular 20 compreende uma pluralidade de membrana ou camadas finas de material polimérico microcelular em que a dita membrana/camada tem 50-1.000 microns de espessura.

18. Substrato de acordo com a reivindicação 17, caracterizado 25 pelo fato de que a dita membrana/camada tem aproximadamente 120 -150 microns de espessura.

19. Substrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o dito material polimérico microcelular compreende um monômero orgânico adicional.

20. Substrato de acordo com a reivindicação 19, caracterizado

pelo fato de que o dito monômero orgânico é selecionado do grupo que consiste de: metacrilato de N-butila, metacrilato de n-hexila, acrilato de cicloexila, metacrilato de cicloexila, acrilato de fenila, metacrilato de fenila, cloreto de 3-vinilbenzila, cloreto de 4-vinilbenzila, para acetoxiestireno.

5 21. Substrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que o dito material polimérico microcelular compreende um polímero orgânico adicional.

10 22. Substrato de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito polímero orgânico é selecionada do grupo que consiste de poli(metacrilato de n-butila), poli(metacrilato de n-hexila), poli(acrilato de cicloexila), poli(metacrilato de cicloexila), poli(acrilato de fenila), poli(metacrilato de fenila), poli(cloreto de 3-vinilbenzila), poli(cloreto de 4-vinilbenzila), poli(para acetoxiestireno).

15 23. Substrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o dito substrato de cultura celular compreende uma superfície que foi modificada pela provisão de um revestimento que facilita a anexação, proliferação e/ou diferenciação de células anexadas a ele.

20 24. Substrato de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a dita modificação é a provisão de um revestimento proteináceo.

25 25. Substrato de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o dito revestimento proteináceo compreende pelo menos uma molécula selecionada do grupo que consiste de: laminina, colágeno, fibronectina, matrizes de peptídeos a base de não colágeno.

26. Substrato de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o dito revestimento proteináceo compreende um revestimento de poliaminoácido.

27. Substrato de acordo com a reivindicação 26, caracterizado

pelo fato de que o dito revestimento de poliaminoácido compreende poli L ornitina ou poli L lisina.

28. Substrato de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a superfície do dito substrato de cultura celular é fisicamente modificado.

29. Método para cultura de células, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

i) fornecer um vaso de cultura celular compreendendo:

a) células;

b) substrato de cultura celular como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28;

c) meio de cultura celular suficiente para manter o crescimento das ditas células; e

ii) fornecer condições de cultura celular que promovem a proliferação e/ou diferenciação das ditas células.

30. Processo para a formação de um material polimérico microcelular, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

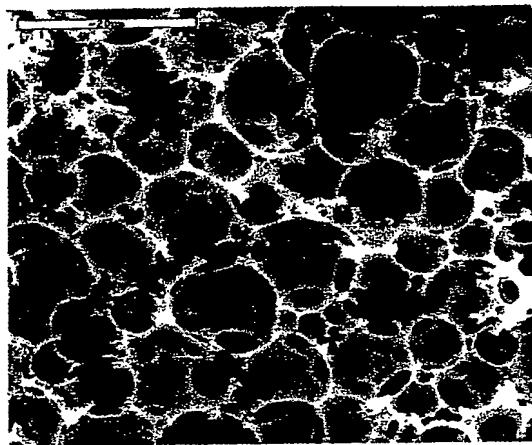
i) formar uma preparação compreendendo uma emulsão de fase interna alta compreendendo um elastômero hidrofóbico em uma concentração entre 20% (p/p) e 40% (p/p);

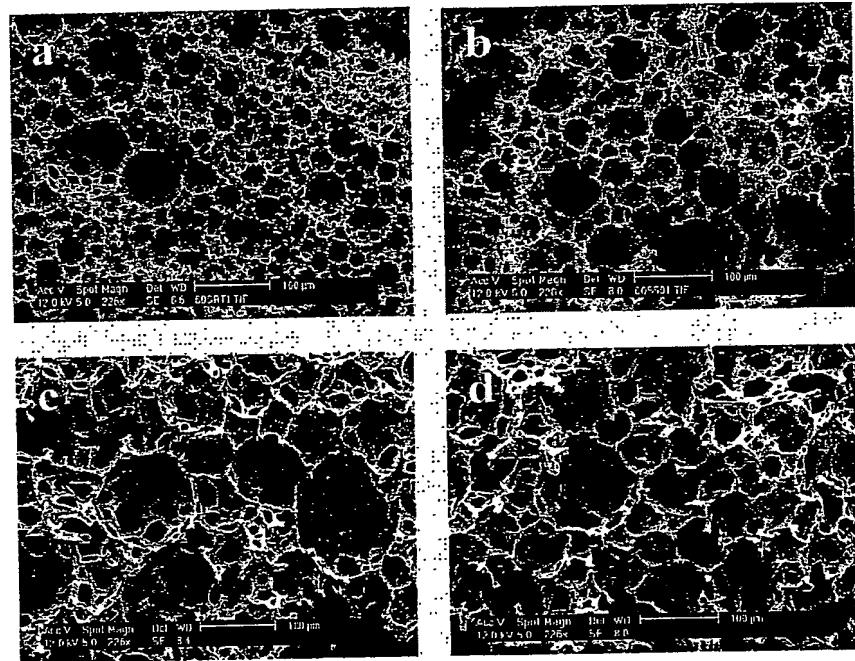
ii) formar uma preparação compreendendo um catalisador;

iii) combinar as preparações em (i) e (ii); e

iv) incubar a preparação combinada para permitir a formação de uma polímero em emulsão de fase interna alta.

Figura 1





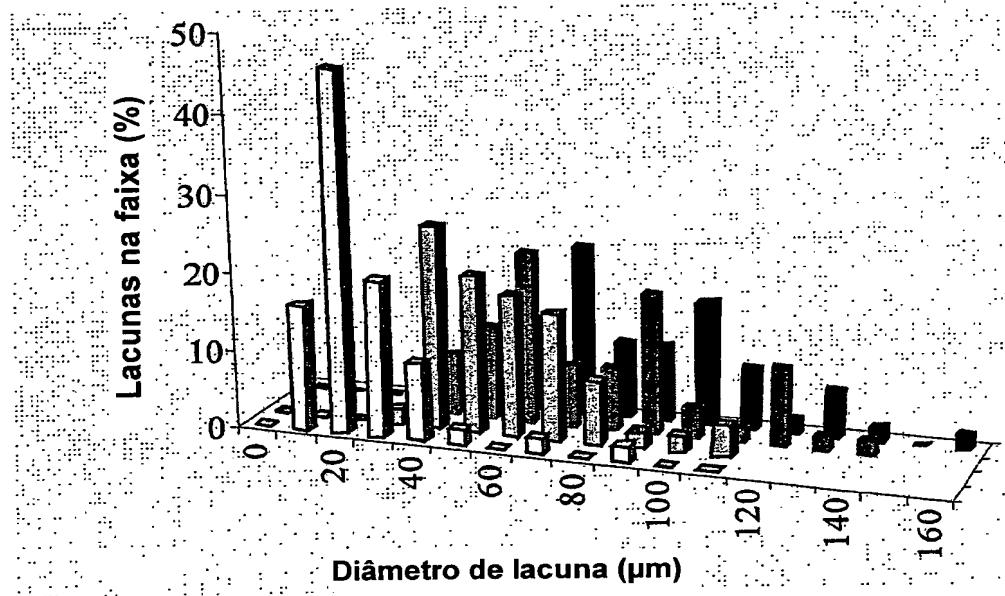


Figura 3

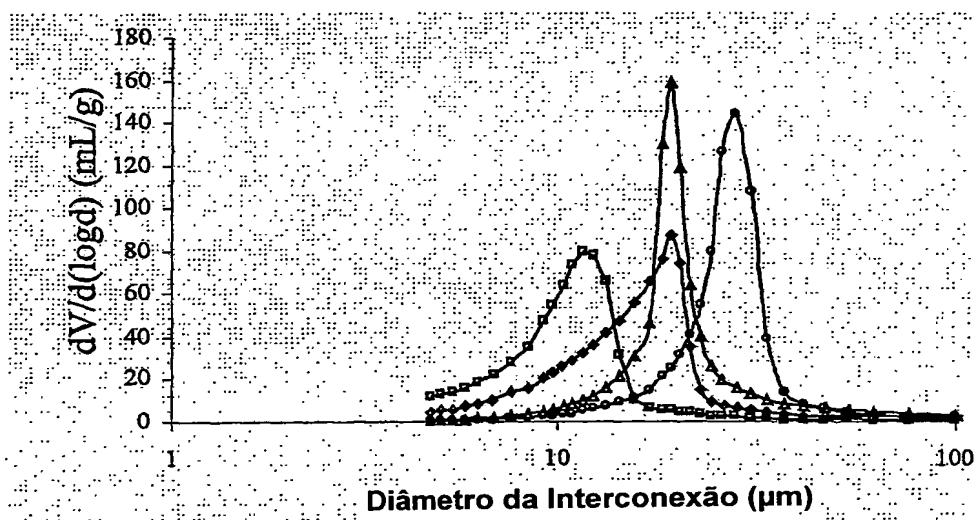


Figura 4

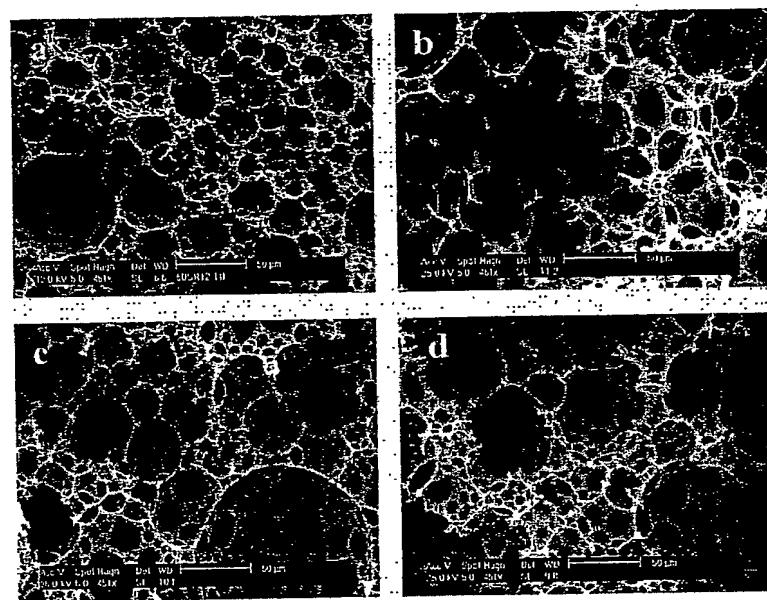


Figura 5

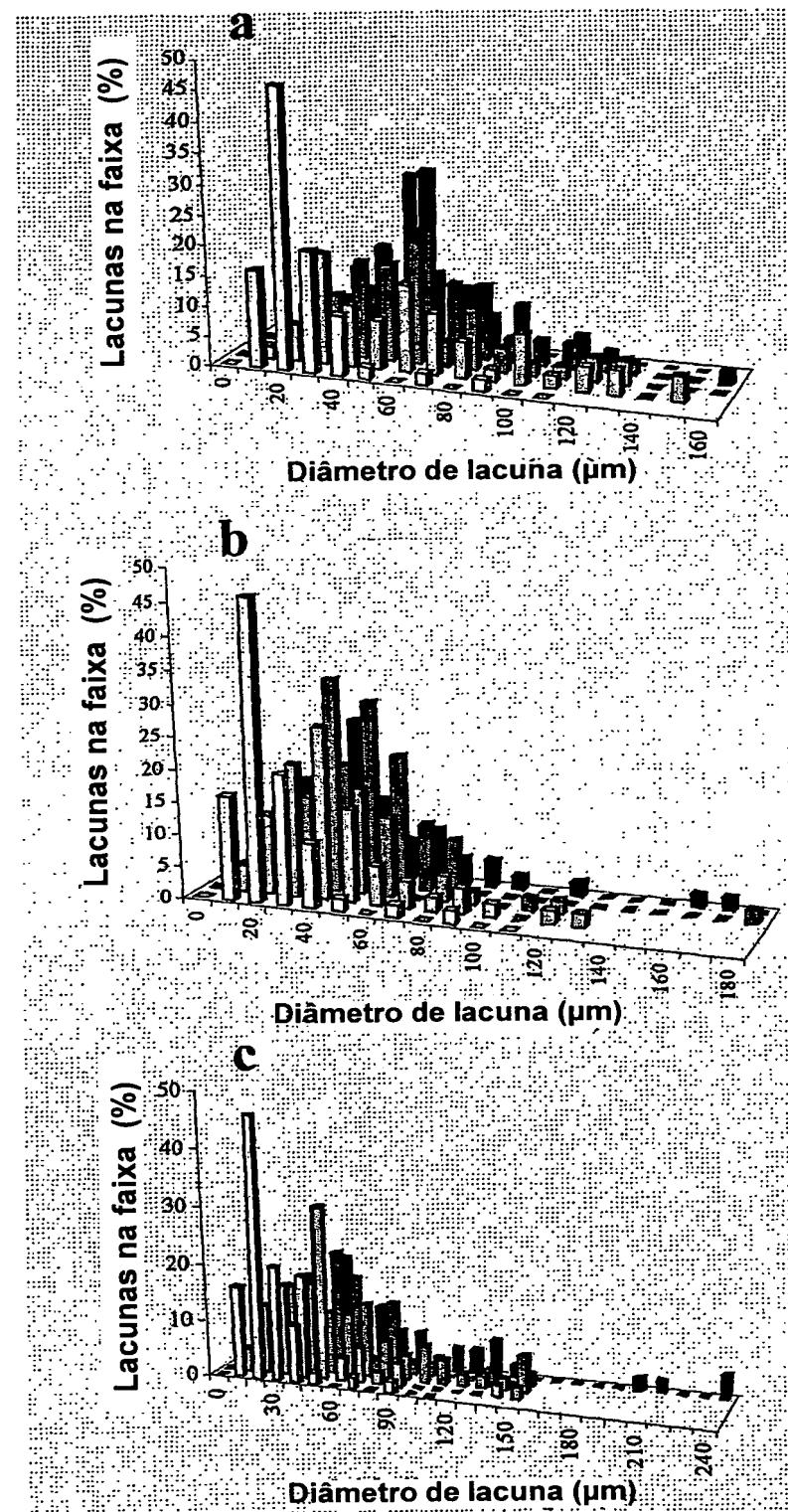


Figura 6

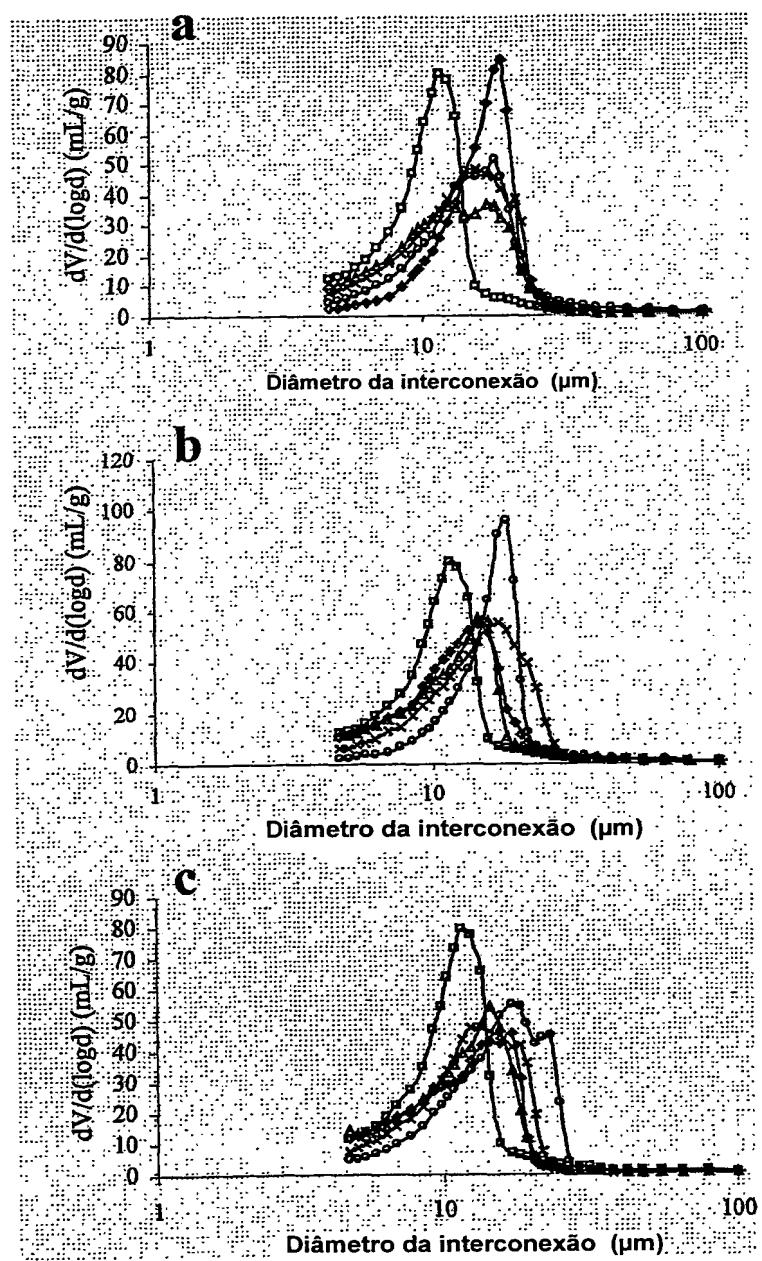


Figura 7

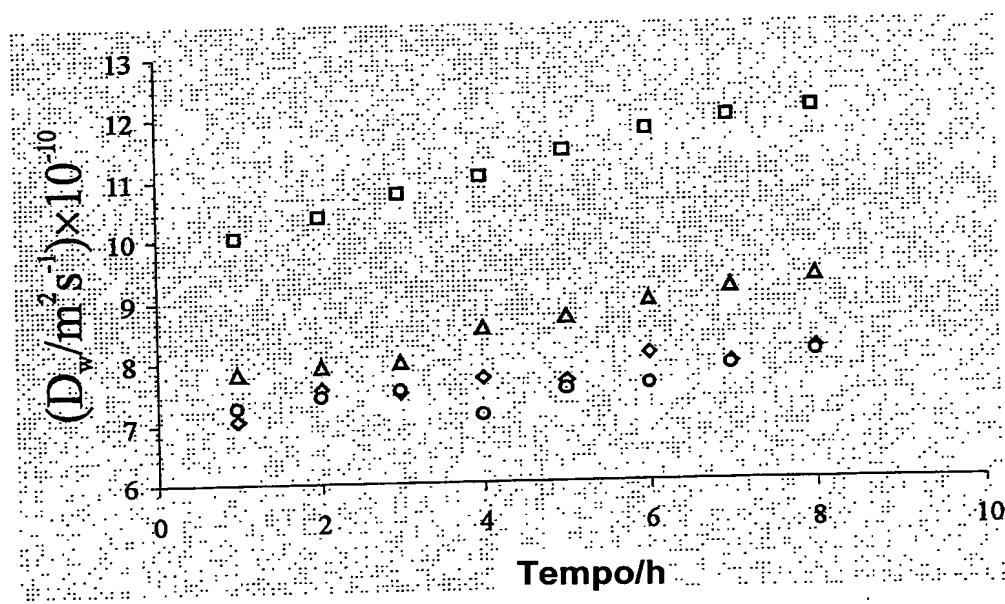


Figura 8

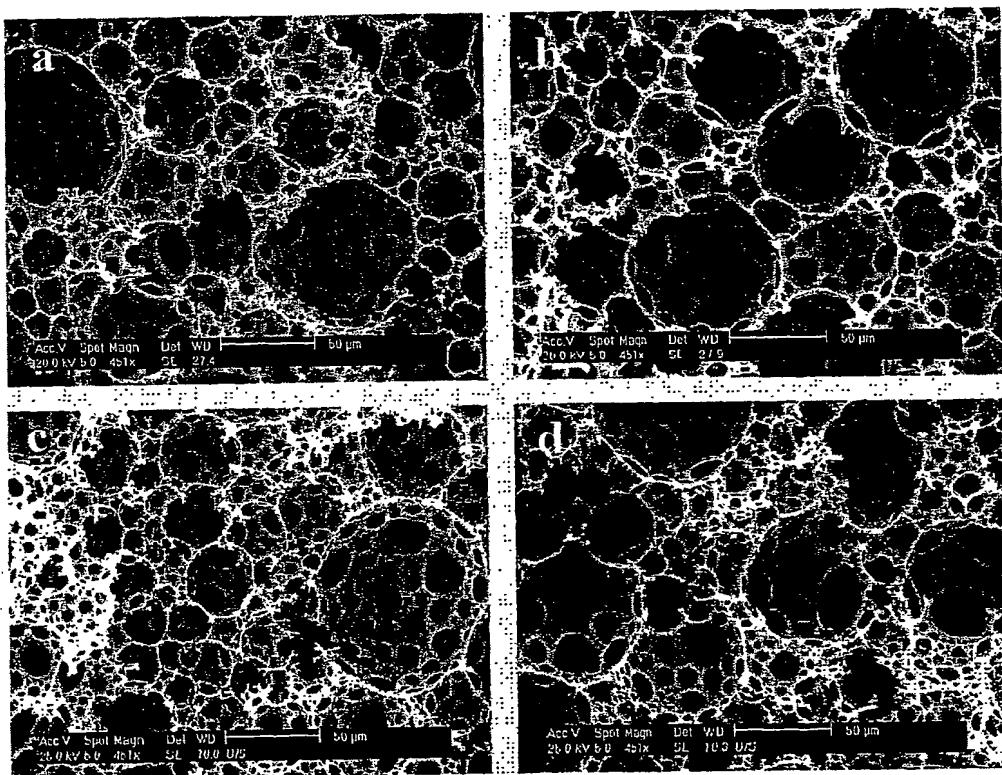


Figura 9

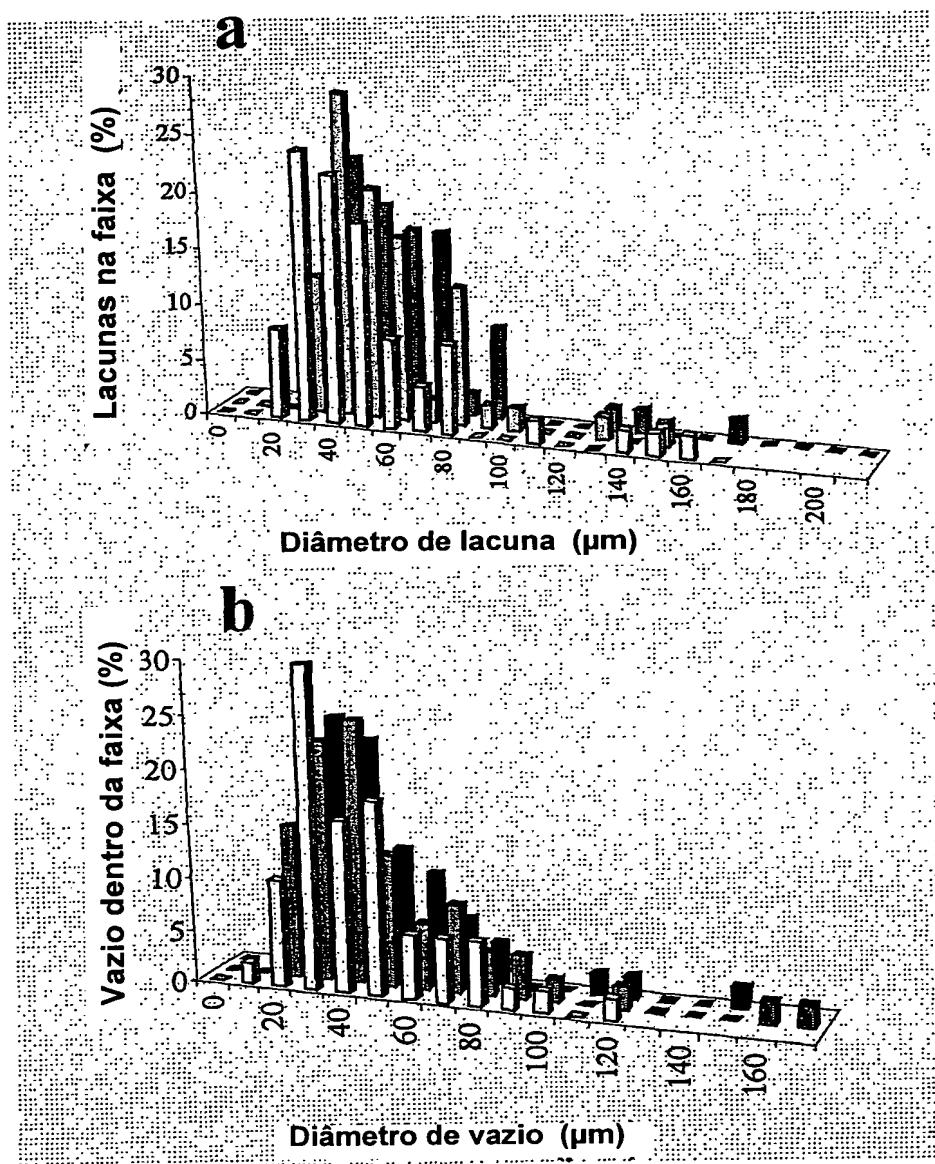


Figura 10

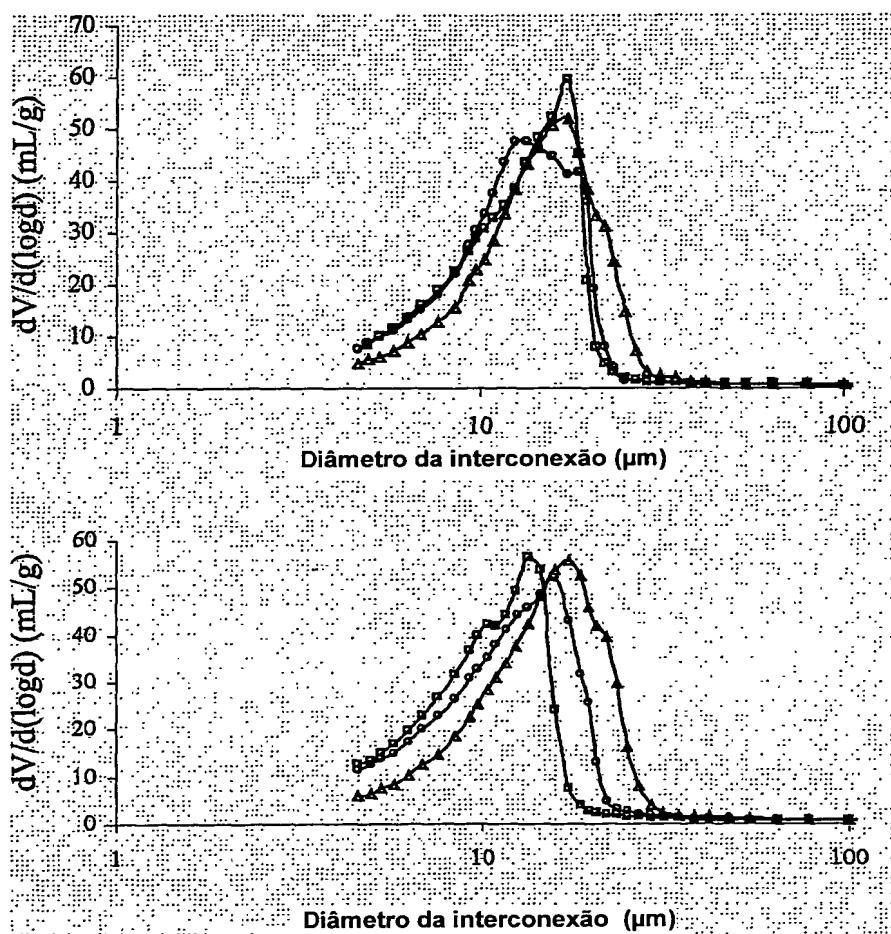


Figura 11

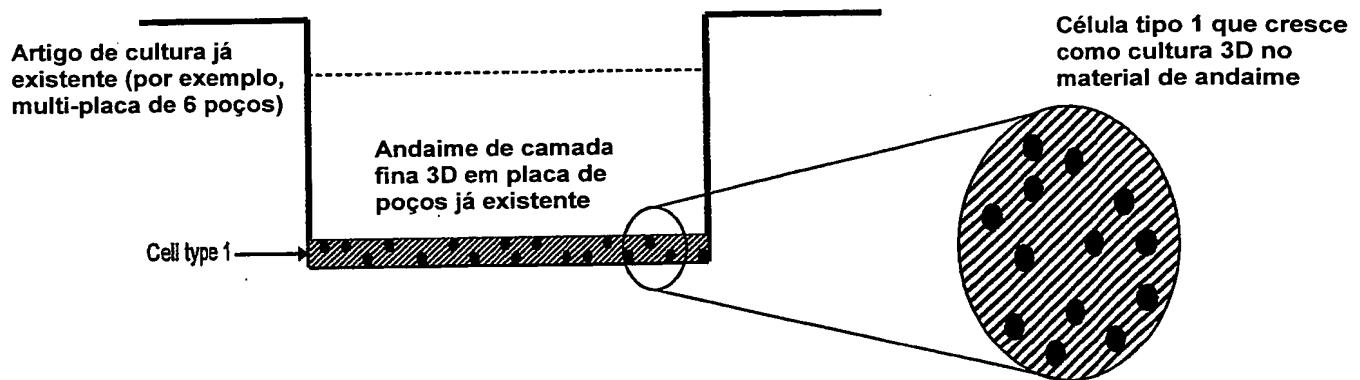
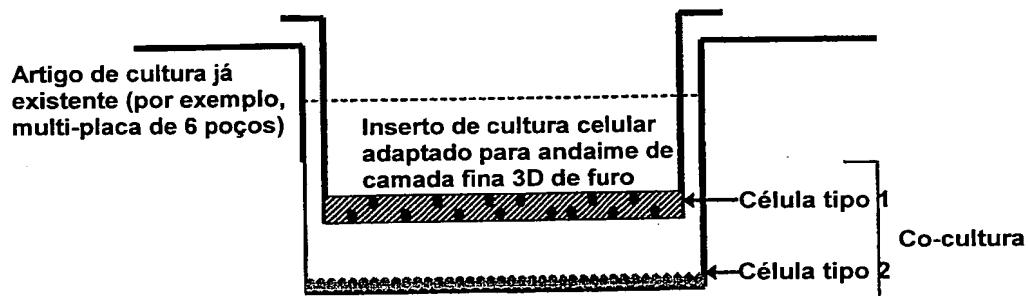
Figura 12**EXEMPLO 1****EXEMPLO 1**

Figura 13

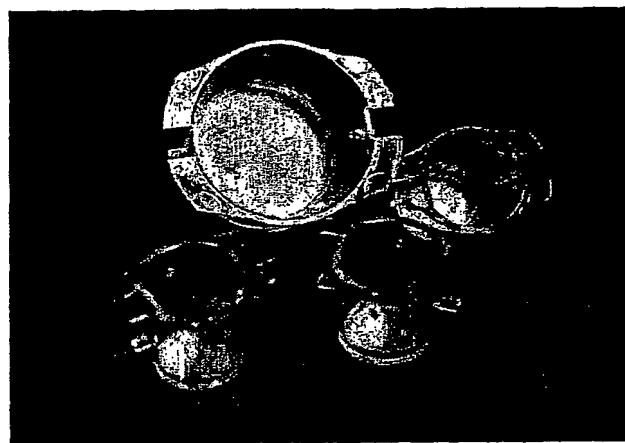


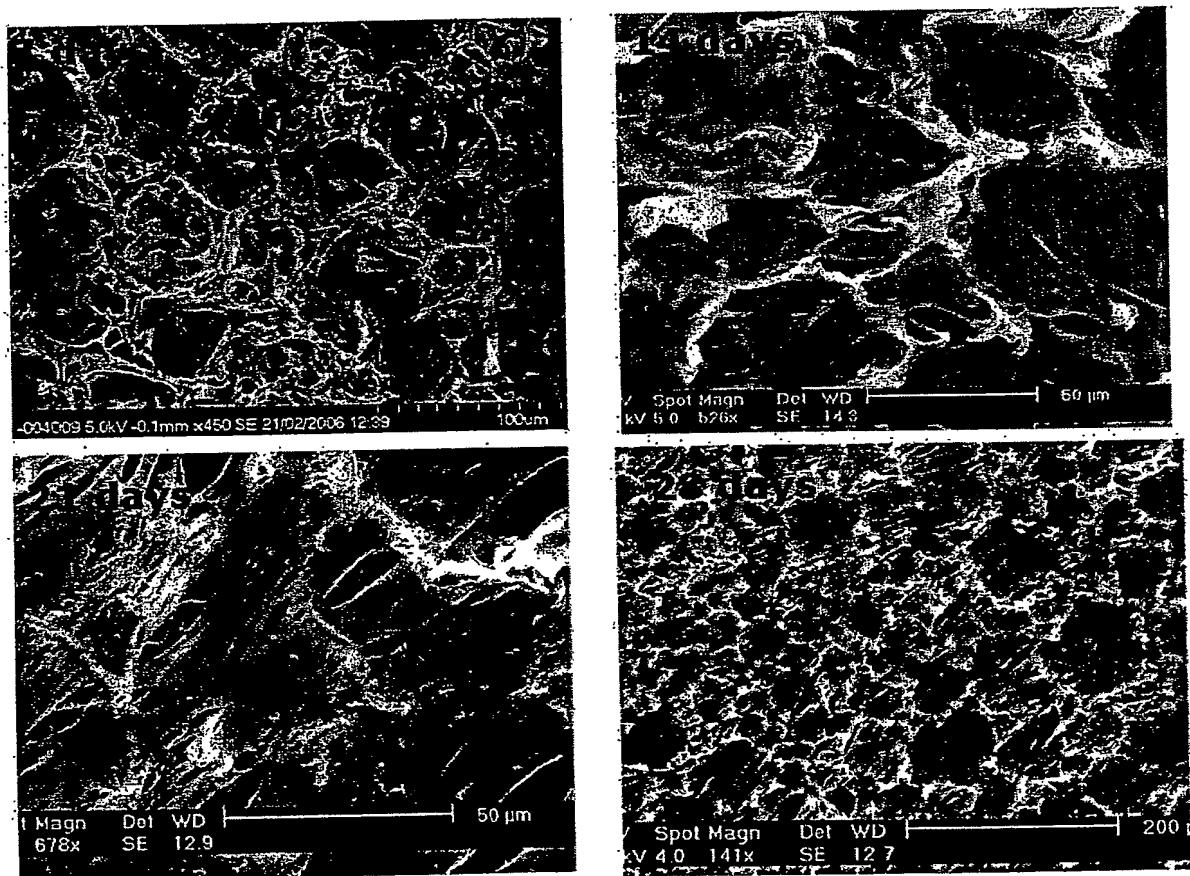
Figura 14

Figura 15



PV 90%



PV 95%

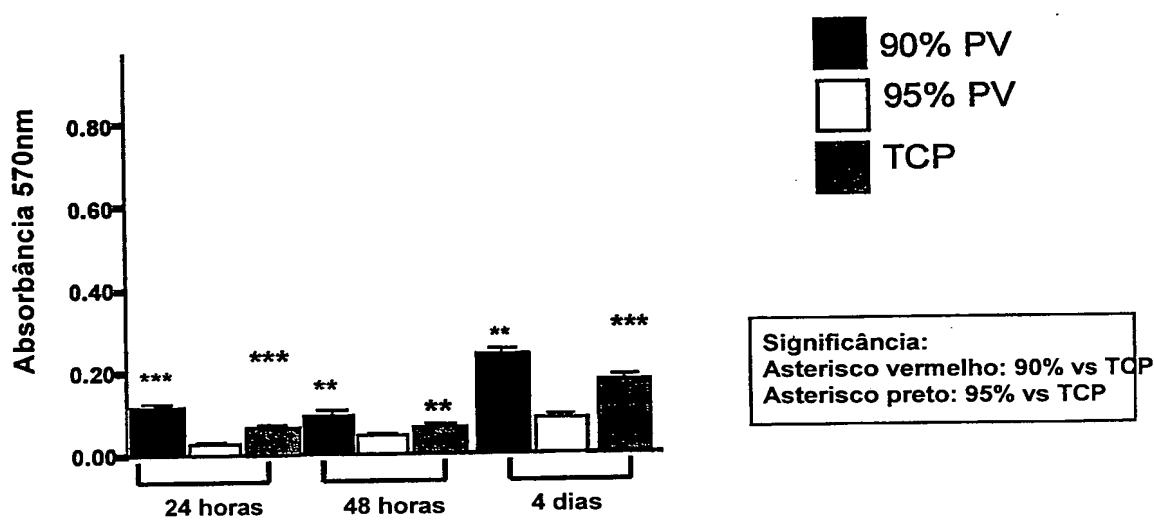
Figura 16

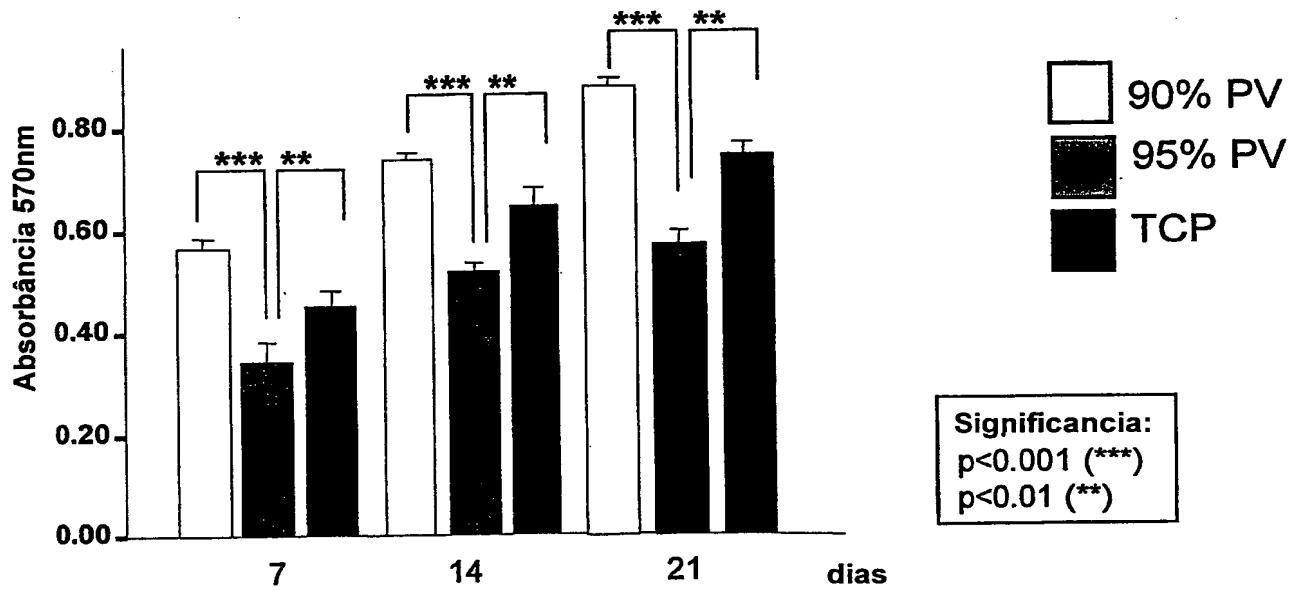
Figura 17

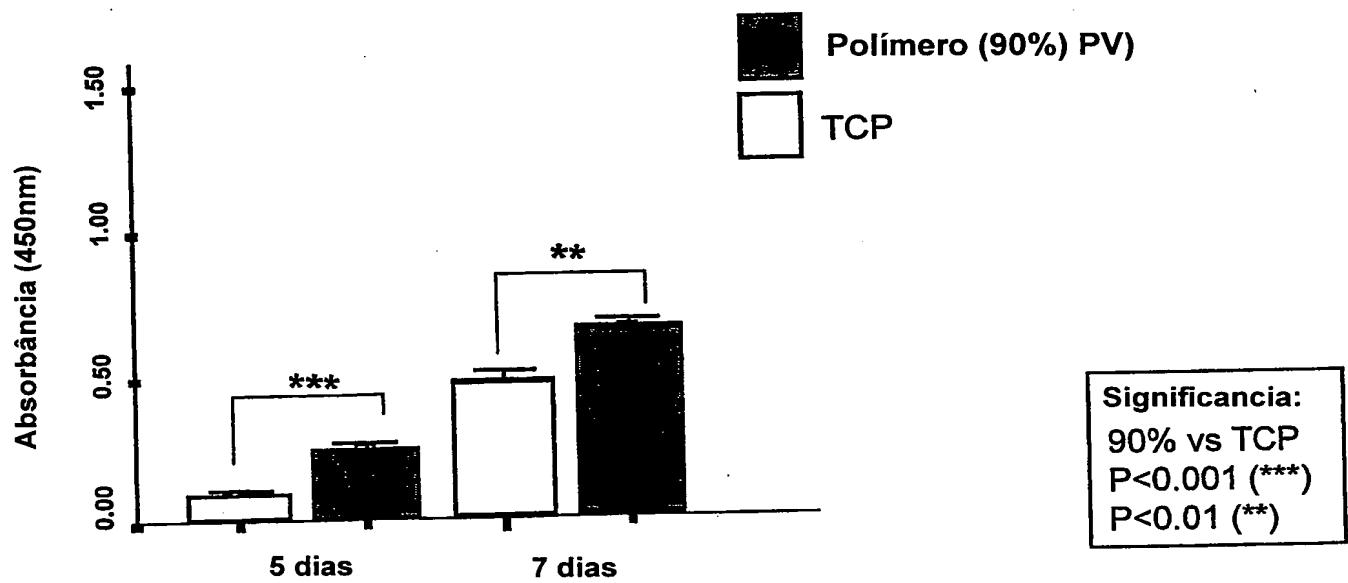
Figura 18

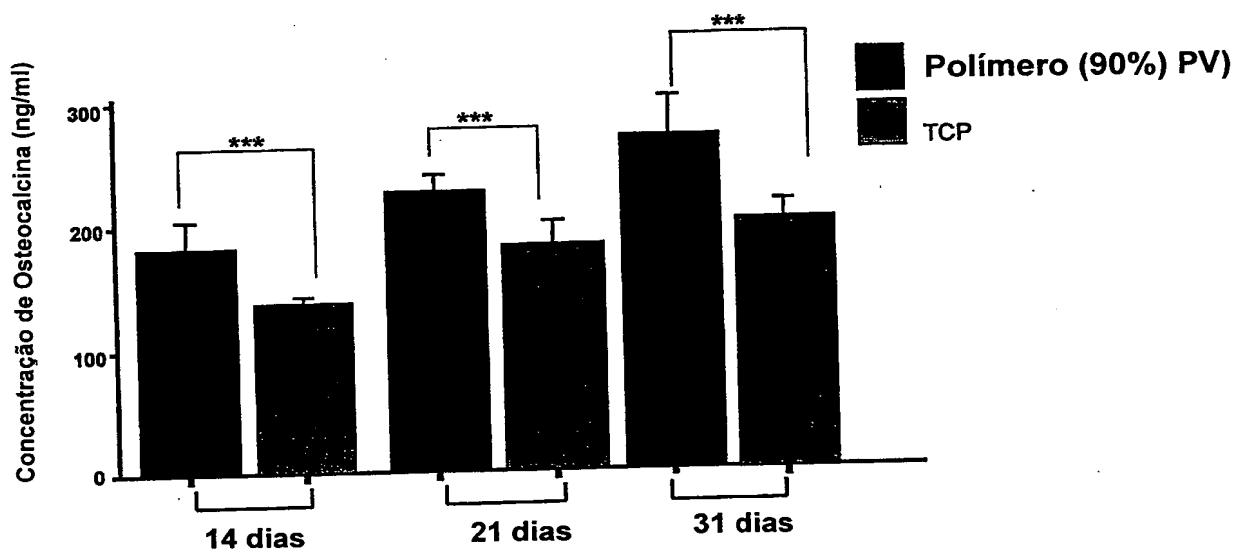
Figura 19

Figura 20

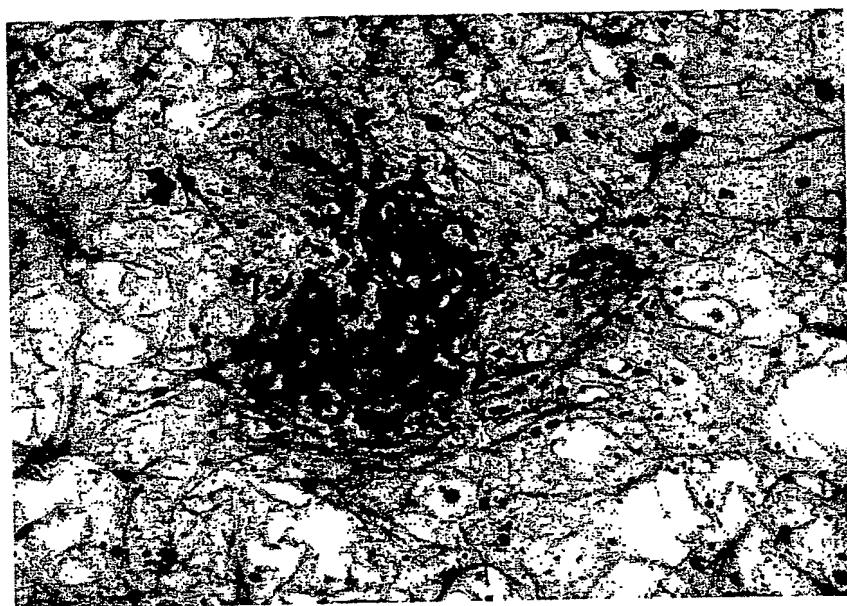


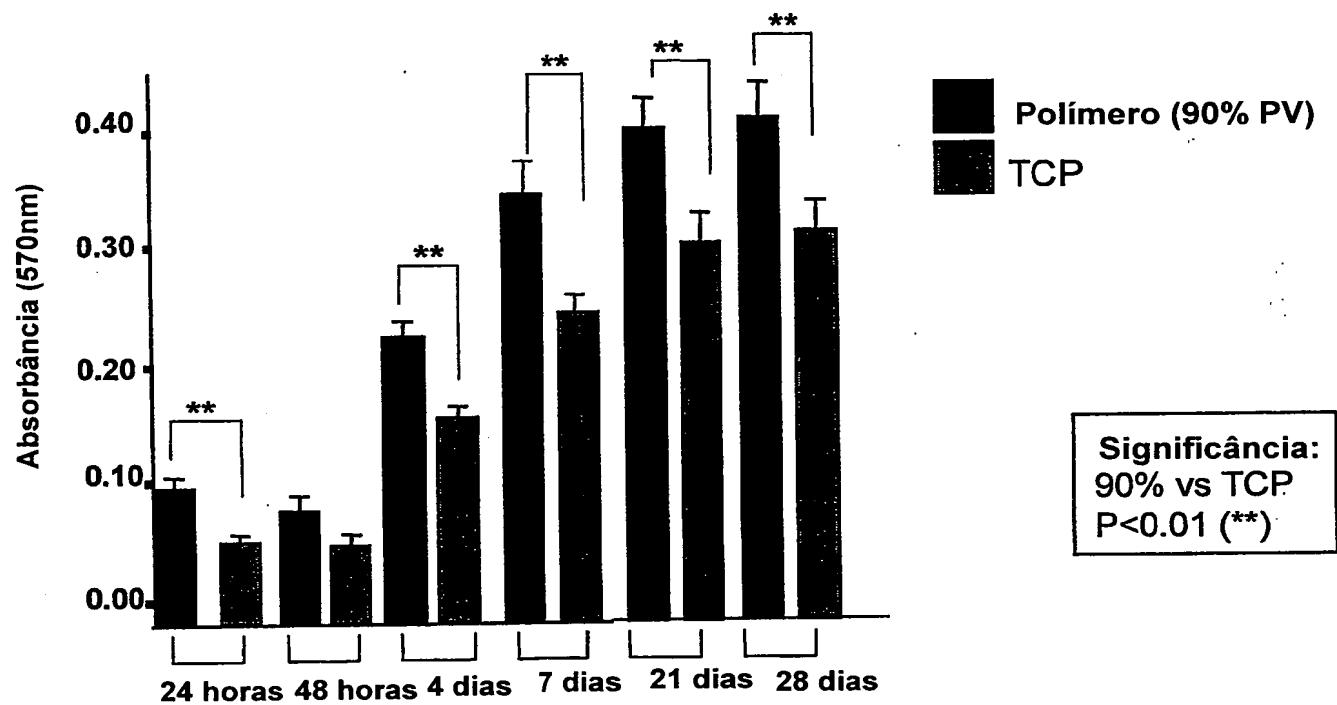
Figura 21

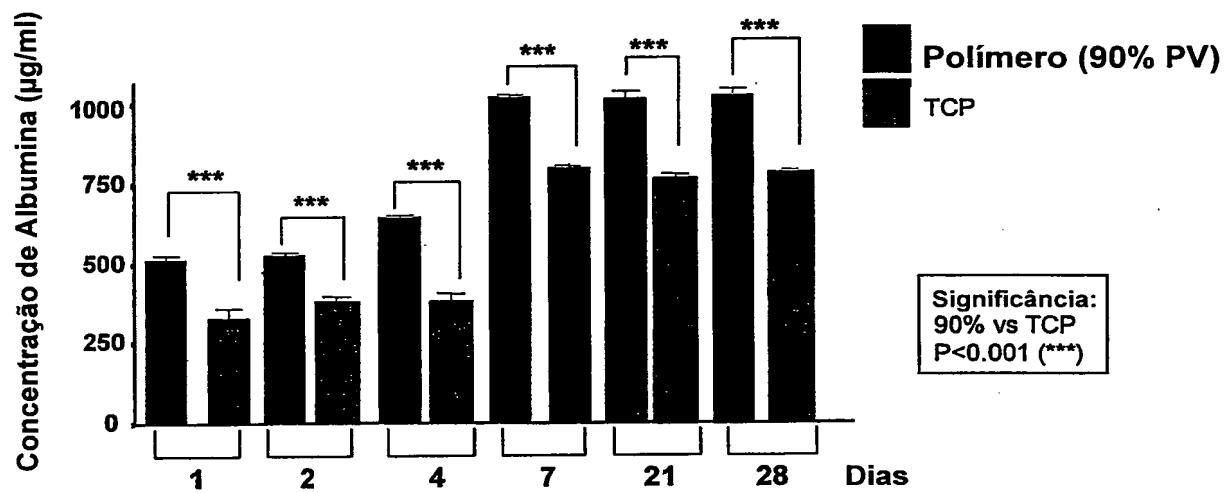
Figura 22

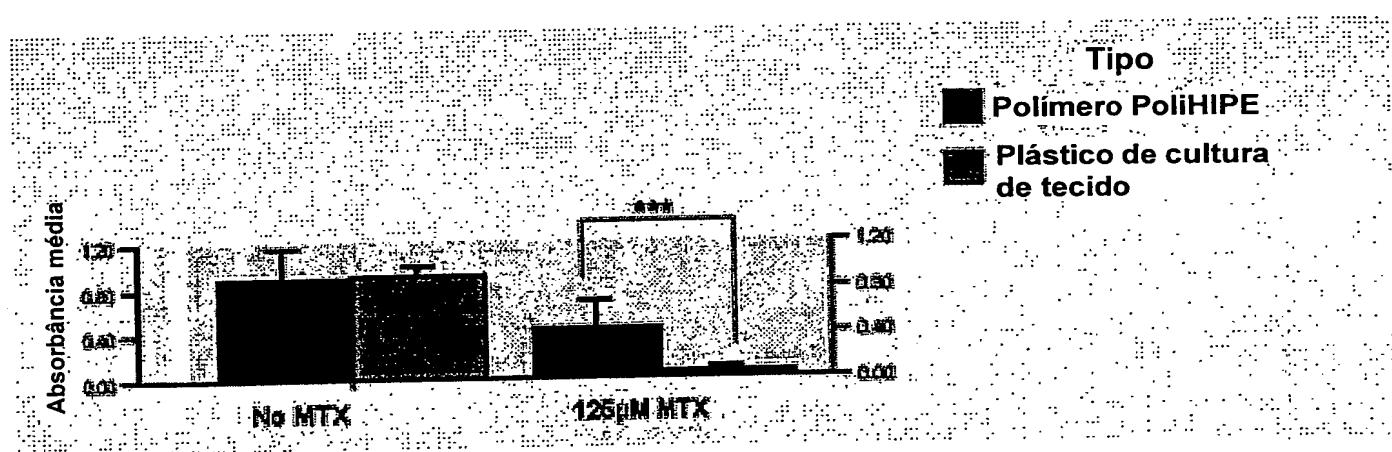
Figura 23

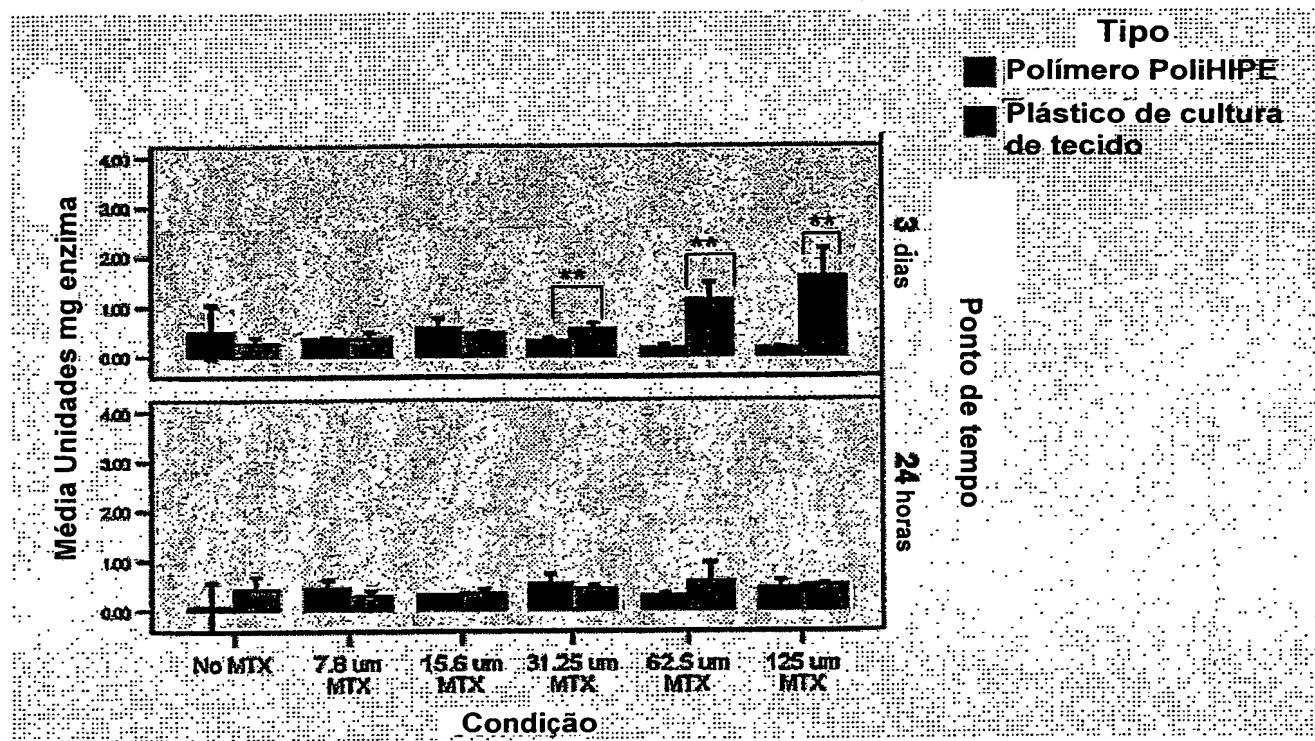
Figura 24

Figura 25

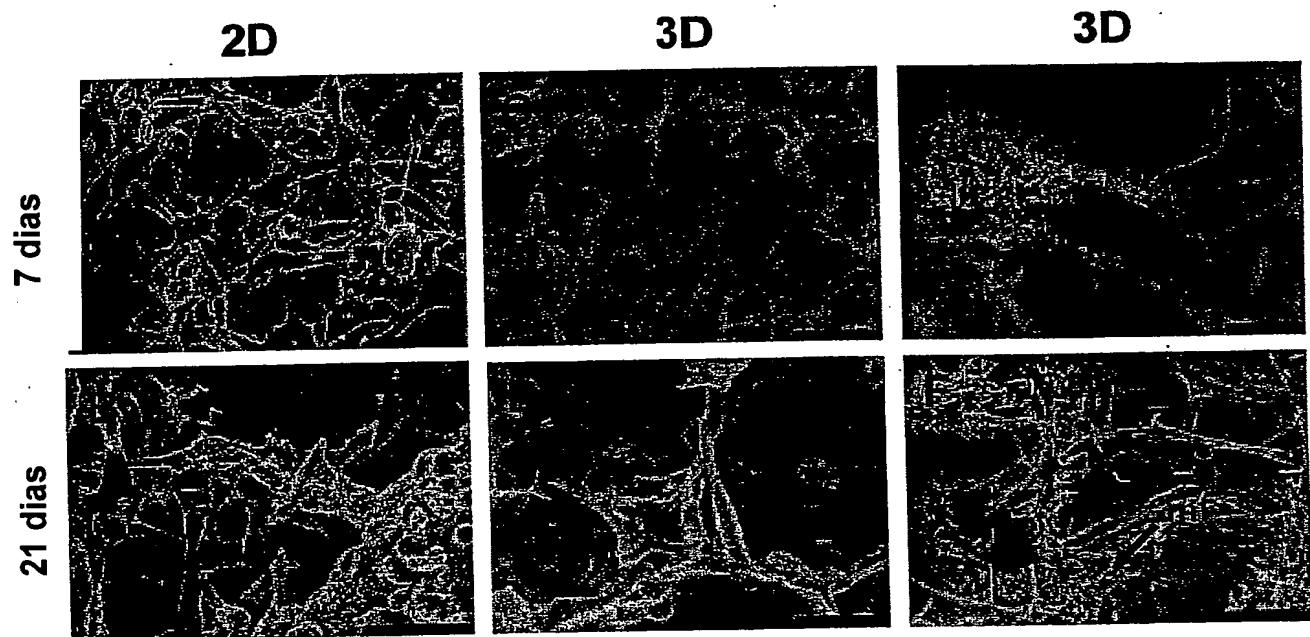


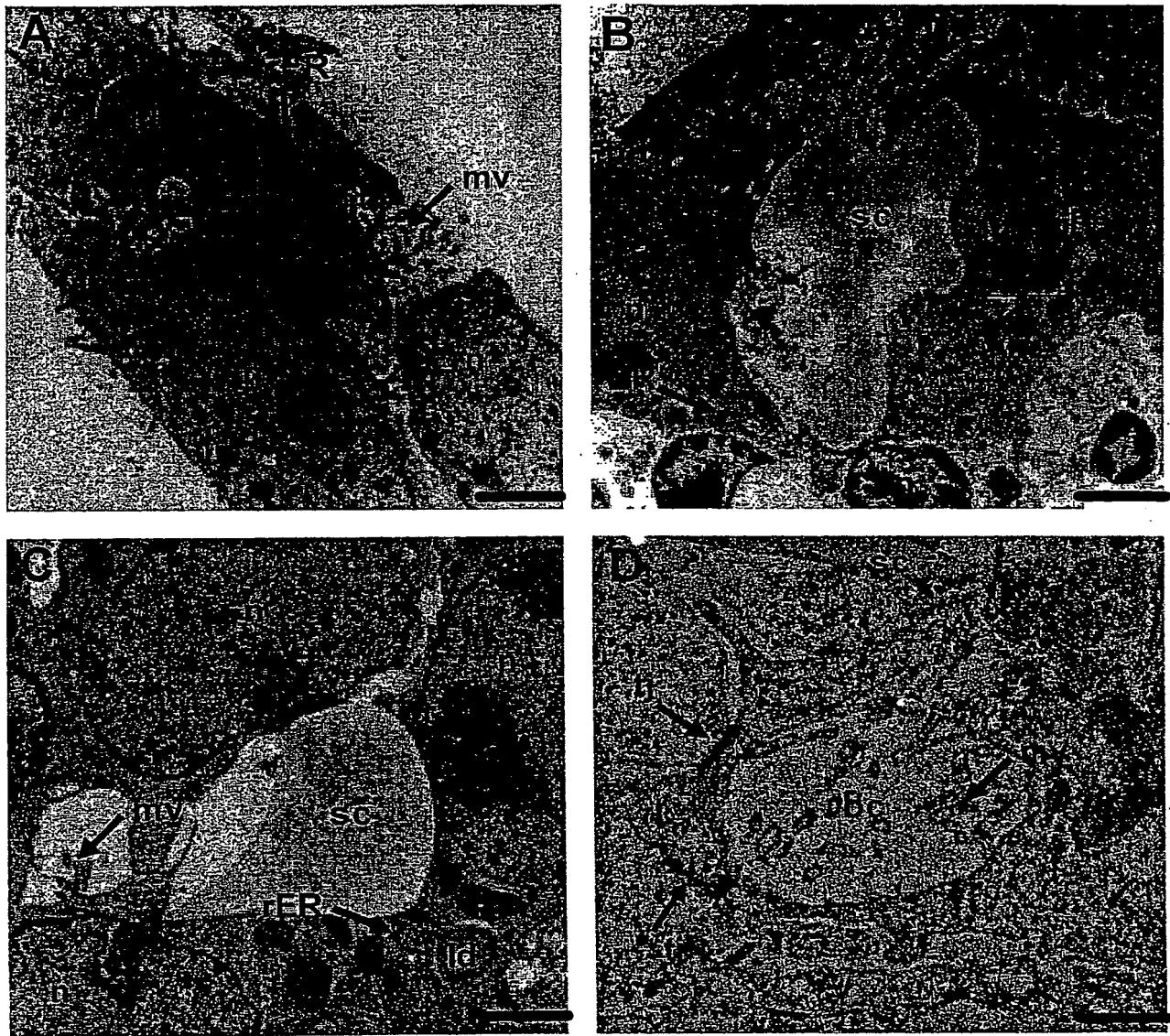
Figura 26

Figura 27

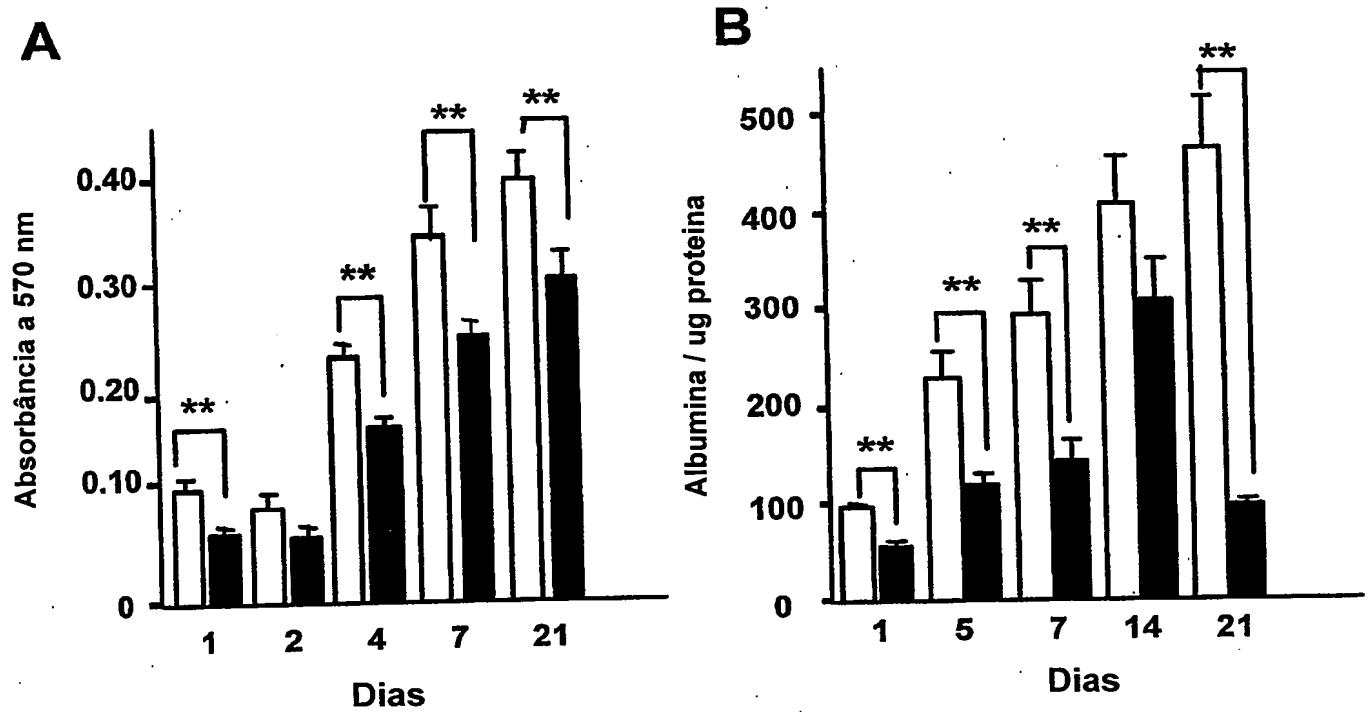


Figura 28

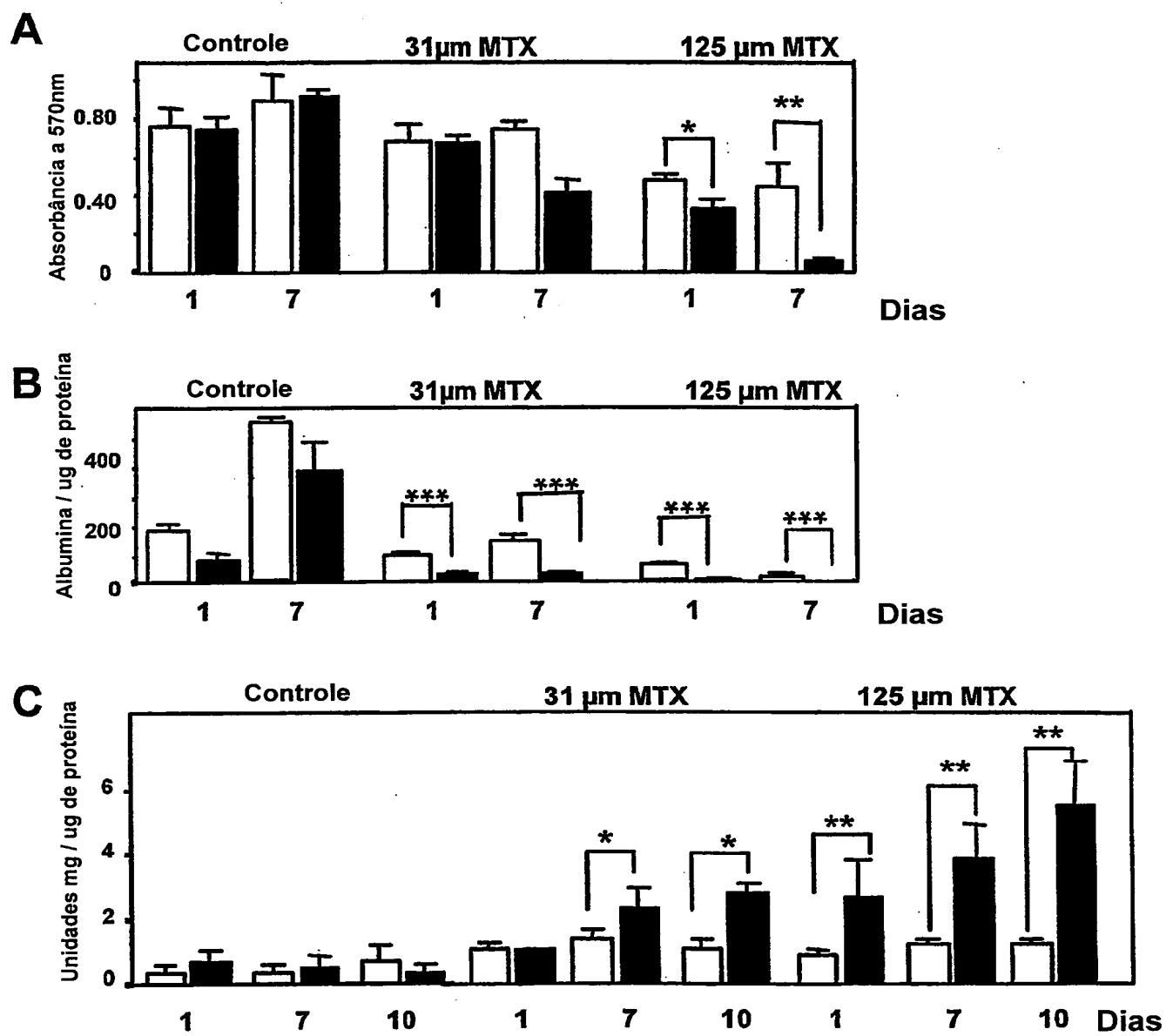


Figura 29

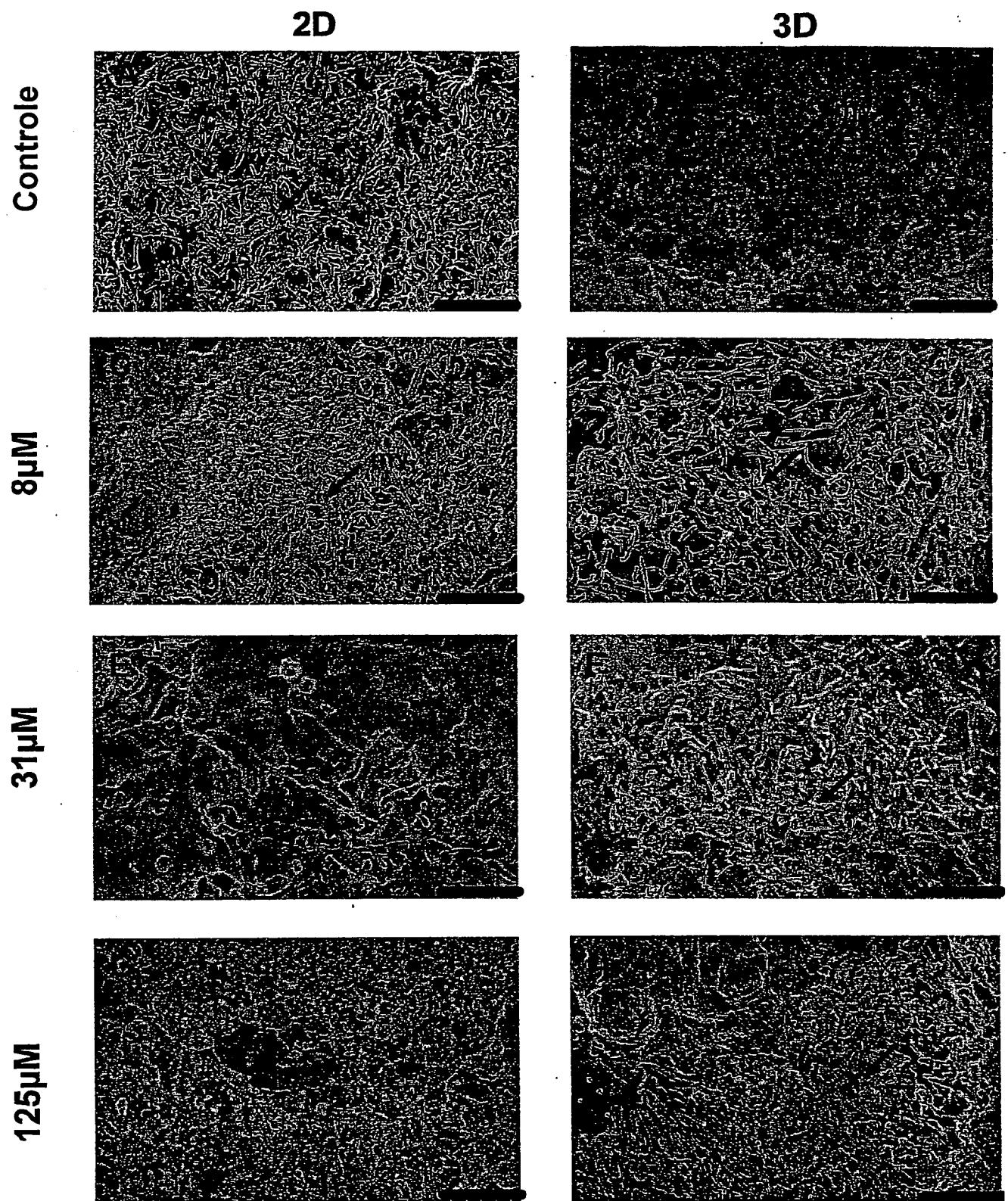
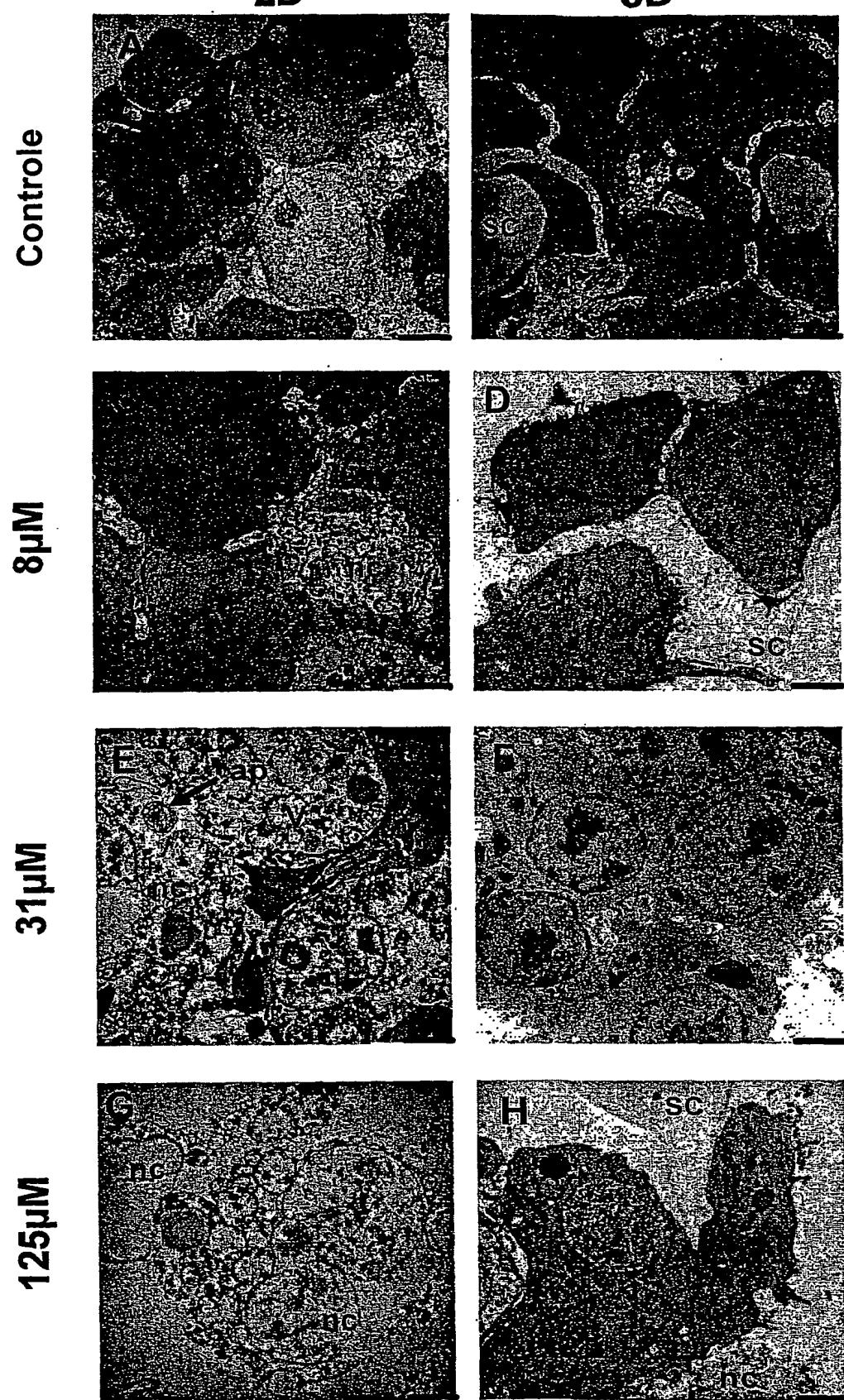


Figura 30



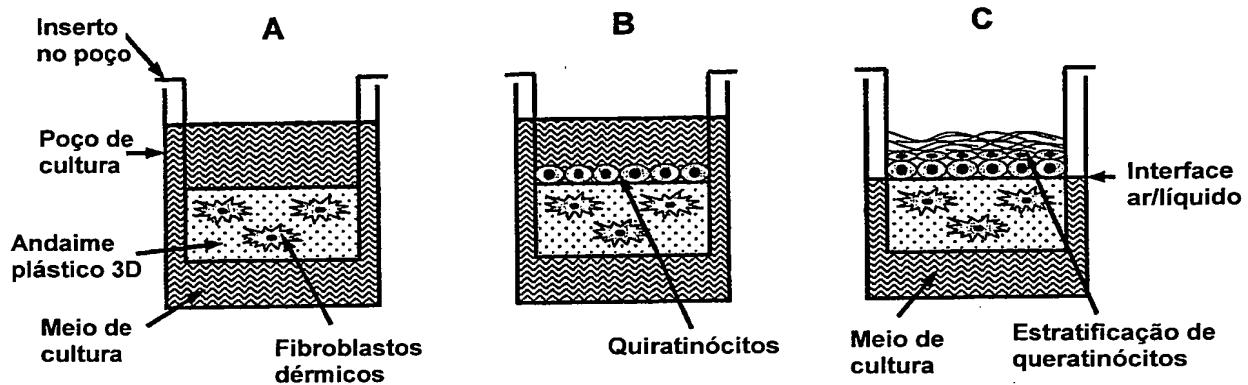
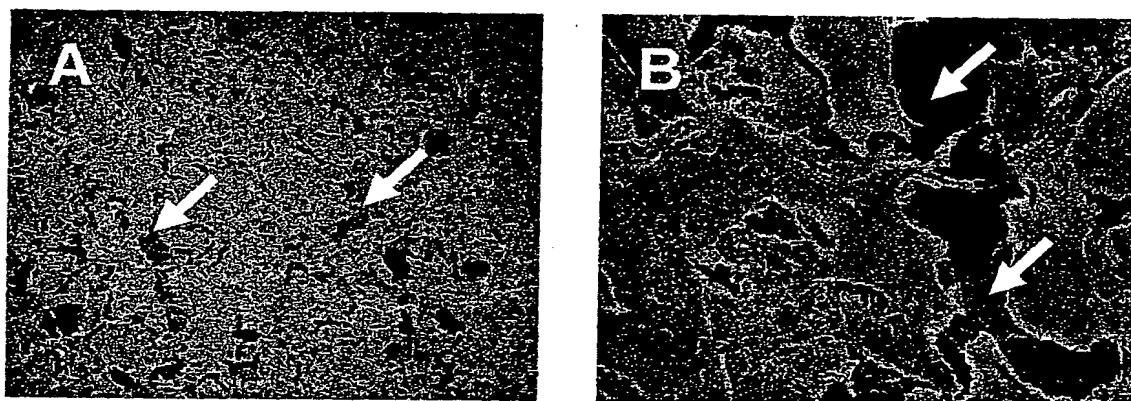


Figura 31

Figura 32



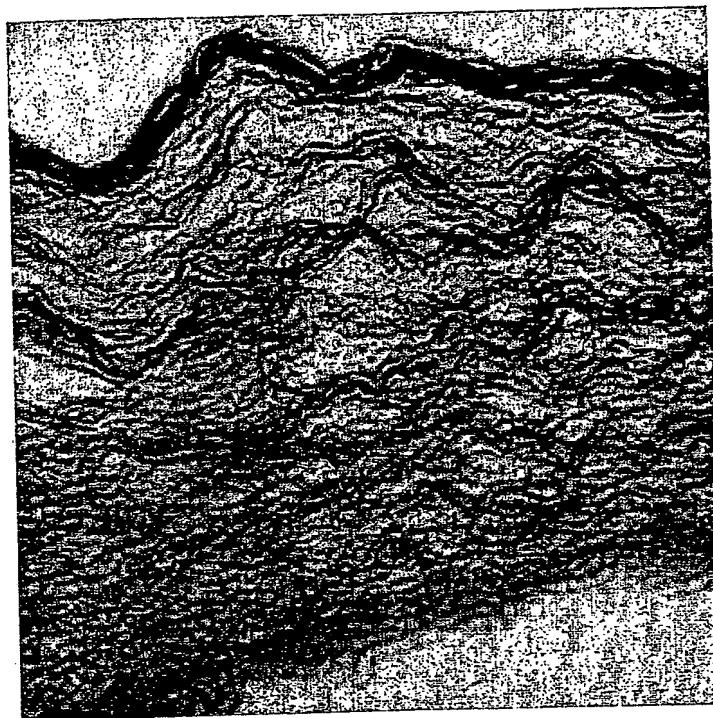


Figura 33

RESUMO

“SUBSTRATO DE CULTURA CELULAR, MÉTODO PARA CULTURA DE CÉLULAS, E, PROCESSO PARA A FORMAÇÃO DE UM MATERIAL POLIMÉRICO MICROCELULAR”

5 É descrito um substrato de cultura celular compreendendo um polímero em emulsão de fase interna altamente polimerizada adaptado e modificado para uso na cultura de rotina de células em três dimensões; tipicamente células de mamífero e o uso do substrato em um sistema de cultura celular para investigação e análise de proliferação, diferenciação e 10 função celular.