

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

Juliana de Sá da Silva

EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
BIORREATOR SINGLE-USE COM MOVIMENTO ONDULATÓRIO
VISANDO APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

São Carlos - SP

2019

Juliana de Sá da Silva

**EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
BIORREATOR SINGLE-USE COM MOVIMENTO ONDULATÓRIO
VISANDO APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

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

Juliana de Sá da Silva

**EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
BIORREATOR SINGLE-USE COM MOVIMENTO ONDULATÓRIO
VISANDO APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador:

Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

São Carlos - SP

2019

de Sá da Silva, Juliana

Expansão de células-tronco mesenquimais em biorreator single-use com movimento ondulatório visando aplicações terapêuticas / Juliana de Sá da Silva. -- 2019.

194 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Claudio Alberto Torres Suazo

Banca examinadora: Álvaro de Baptista Neto; Elisabeth de Fatima Pires Augusto; Fernanda Perpétua Casciotori; Kamilla Swiech

Bibliografia

1. Célula-Tronco Mesenquimal (CTM). 2. Biorreator Single-Use com Movimento Ondulatório. 3. Interação Microcarregador-Cellbag. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE JULIANA DE SÁ DA SILVA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 30 DE ABRIL DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Claudio Alberto Torres Suazo
Orientador, UFSCar



Álvaro de Baptista Neto
UNESP



Elisabeth de Fatima Pires Augusto
UNIFESP



Fernanda Perpétua Casciadori
UFSCar



Kamilla Swiech
USP

Em memória da minha querida avó, Olga Martins Lima.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado nessa jornada, pelo carinho, conselhos, apoio e pensamento positivo.

Ao prof. Claudio Suazo, pela confiança no meu trabalho, por todo o apoio, conselhos e ensinamentos ao longo desses anos.

À profa. Kamilla Swiech, Amanda, Nadia e Mário, do CTC - Hemocentro de Ribeirão Preto, pela colaboração com empréstimo de equipamento, o que permitiu a finalização dos experimentos, e pela ajuda e tempo disponibilizados com análises.

Ao prof. Valtencir Zucolotto e ao Edson, do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), pelo auxílio com o NanoSight e pelo tempo disponibilizado para análises.

Ao prof. Odílio Assis, Jéssica e Taís, da Embrapa Instrumentação, por todo o auxílio com as análises conduzidas na Cellbag.

À profa. Patricia Severino e à profa. Luciana Marti, do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, pela parceria com as análises de expressão gênica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

“And regardless of whether you got a yes or no, it was very useful information, if you did the experiment right. Now, the key is doing the experiment right. But those were some of the guiding principles that I had.”

Herbert W. Boyer

RESUMO

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) e Vesículas Extracelulares (VEs) derivadas das CTMs estão sendo visadas em diferentes áreas clínicas. As CTMs estão presentes em baixas concentrações nos tecidos, tornando necessária a sua expansão *in vitro* para viabilizar a aplicabilidade terapêutica. A tecnologia de biorreator descartável (*single-use*), como o modelo com movimento ondulatório - Biorreator Wave™, é atrativa devido à possibilidade de operação em sistema controlado e previamente esterilizado. Porém, o movimento ondulatório unidirecional leva à formação de depósitos de partículas (microcarregadores e células) na Cellbag. A formação de depósitos “tipo duna” e de depósitos nas laterais da Cellbag (região de borda do líquido) é facilitada pelo aumento da hidrofiliabilidade do filme interno da Cellbag durante o cultivo. Esse problema prejudica a proliferação das CTMs, acarretando em fatores de expansão celular (FE) abaixo de 2,0. O objetivo deste trabalho consistiu no melhoramento do desempenho do Biorreator Wave™ 2/10 na adesão e expansão de CTMs humanas provenientes de cordão umbilical (CTM-CU), e caracterização dos cultivos com relação ao potencial de expansão e perfil terapêutico da CTM-CU. O formato da Cellbag foi modificado utilizando um suporte, elaborado nesta tese, e colocado sobre a plataforma de agitação, com objetivo de reduzir os depósitos de microcarregadores. Foram realizados cultivos utilizando microcarregador CultiSpher-S® e MAG, com meio de cultivo α -MEM (10% v/v SFB). Duas abordagens foram avaliadas com o novo formato da Cellbag: 1) fase de adesão em spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™ com CultiSpher-S® (FE: 7,3±1,1) e 2) fase de adesão e expansão no Biorreator Wave™ com CultiSpher-S® (FE entre 6,3 e 25,6) e MAG (FE: 5,5±0,6). As CTM-CU coletadas dos cultivos no Biorreator Wave™ apresentaram os requisitos mínimos de qualidade. Os cultivos controle em spinner com MAG e CultiSpher-S® e o cultivo no Biorreator Wave™ com CultiSpher-S® apresentaram regulação positiva de genes ligados às funções biológicas de adesão celular, resposta inflamatória, resposta imune, organização da matriz extracelular e produção de colágeno, em relação ao cultivo 2D-estático. Os cultivos no Biorreator Wave™ produziram, em média, 11 vezes mais VEs por CTM-CU quando comparados ao cultivo em spinner. Os resultados obtidos mostraram que a modificação do formato da Cellbag inibiu a formação de depósitos “tipo duna”, o que melhorou o desempenho do Biorreator Wave™, tornando viável o emprego de biorreatores com movimento ondulatório em bioprocessos com células-tronco.

Palavras chave: Célula-Tronco Mesenquimal (CTM); Biorreator Single-Use com Movimento Ondulatório; Interação Microcarregador-Cellbag; Cellbag modificada; Expressão Gênica; Vesículas Extracelulares (VEs).

ABSTRACT

Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) and MSC-derived Extracellular Vesicles (EVs) are being targeted in different medical areas. The MSCs are present in small proportions in tissues, thus making an *in vitro* expansion necessary, which allows the therapeutic applicability. The single-use bioreactor technology, such as the Wave-Induced Motion Bioreactor (WIMB), is attractive due to the possibility of controlled and pre-sterilized system operation. However, the unidirectional wave motion leads to the formation of particle deposits (microcarriers and cells) on the Cellbag. The formation of the "dune-like" deposits and the deposits at the Cellbag wall (border region of the liquid) is facilitated by the increase in the hydrophilicity of the Cellbag inner film during culture. This problem impairs the MSC expansion, leading to cell expansion factors (EF) lower than 2.0. The objective of this work was to improve the Wave Bioreactor™ 2/10 performance in the adhesion and expansion of Human Umbilical Cord Matrix derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells (hUCM-MSCs) and to evaluate the cultures with respect to the expansion potential and the hUCM-MSCs therapeutic profile. The Cellbag design was modified by the implementation of a grid designed in our laboratory and placed on the platform, aiming to reduce the microcarrier deposits. Cultures were performed using CultiSpher-S® and MAG microcarriers with α -MEM culture media (10% v/v FBS). Two approaches were evaluated with the new Cellbag design: 1) adhesion phase in spinner and expansion in the WIMB with CultiSpher-S® (EF: 7.3 ± 1.1 fold) and 2) adhesion and expansion phases in the WIMB with CultiSpher-S® (EF between 6.3 and 25.6 fold) and MAG (EF: 5.5 ± 0.6 fold). The hUCM-MSCs harvested from the WIMB cultures showed the quality attributes. The control cultures in spinner with MAG and CultiSpher-S® and the WIMB cultures with CultiSpher-S® showed upregulated genes linked to biological functions of cell adhesion, inflammatory response, immune response, extracellular matrix organization and collagen synthesis, in relation to the monolayer-static culture. The WIMB cultures produced, on average, 11 times more EVs per hUCM-MSC when compared to the spinner culture. These results showed that the Cellbag design modification inhibited the formation of "dune-like" deposits, which improved the WIMB performance, making possible the use of wave-induced motion bioreactors in stem cell bioprocessing.

Keywords: Mesenchymal Stem/Stromal Cell (MSC); Wave-Induced Motion Bioreactor (WIMB); Microcarrier-Cellbag Interaction; New Cellbag design; Gene Expression Pattern; Extracellular Vesicles (EVs).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Processo simplificado apresentando o potencial de expansão e de diferenciação das Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) e os itens para caracterização das CTMs..... 7
- Figura 2. Fases típicas presentes no cultivo de células animais. 9
- Figura 3. Simplificação das vias metabólicas de consumo de glicose e glutamina e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Legenda: 6-P-G: 6-P-gluconato; Gli-6P: glicose-6-fosfato; R-5P: ribose-5-fosfato; GAP: gliceraldeído; DHAP: dihidroxiacetona; AcCoA: acetil-coenzima A; OAA: oxaloacetato; α CG: α cetogluturato..... 10
- Figura 4. Plataformas para expansão de CTMs, apresentando a variação de escala de produção e do nível de tensão de cisalhamento, partindo de frascos de cultura para sistemas dinâmicos homogêneos..... 16
- Figura 5. Modelos para cultivo de Células-Tronco Mesenquimais. Classificação quanto ao modo de crescimento e tipo de agitação. 17
- Figura 6. A: Zonas de transição do regime laminar ($Re_{mod} < 200$) para o regime turbulento (Re_{mod} superior ao valor apresentado pelas barras verticais) para Cellbags com diferentes capacidades. B: Valores de Re_{mod} em relação ao volume operacional para Cellbags com diferentes capacidades operando com agitação de 18 rpm e ângulo de inclinação de 8° ($V_{máximo}$: volume operacional máximo)..... 28
- Figura 7. Magnitude dos vórtices formados na fase líquida para Cellbag com 5 L e inclinação de 7° : (A): 15 rpm e (B) 30 rpm..... 29
- Figura 8. Potência específica dissipada (P/V) de acordo com a agitação da plataforma (entre 6 e 30 rpm) para Cellbag de 2 L, operando com 1 e 0,2 L, com ângulo de inclinação da plataforma de 7° e 10° 29
- Figura 9. Estrutura geral do conjunto de experimentos de cultivo da CTM-CU e principais análises realizadas na presente tese. 33
- Figura 10. Esquema do procedimento adotado na realização dos cultivos da CTM-CU no Biorreator WaveTM e em frasco spinner. 35
- Figura 11. (A): Biorreator WaveTM e equipamentos auxiliares utilizados nos cultivos da CTM-CU. Plataforma 2/10 com Cellbag de 2 L operada dentro do suporte e módulo de Controle WavepodTM II. (B): Frasco spinner de 500 mL utilizado nos cultivos da CTM-CU..... 38
- Figura 12. (A) Esquema do procedimento de tratamento das amostras e análises realizadas durante os cultivos da CTM-CU no Biorreator WaveTM e frasco spinner. (B) Análises realizadas nas CTM-CU coletadas ao término dos cultivos e (C) análises realizadas no meio condicionado derivado da CTM-CU. 39
- Figura 13. (A): Suporte de acrílico desenhado e construído no LATECC para modificação do formato da Cellbag, visando evitar a segregação dos microcarregadores colonizados com CTM-CU durante os cultivos. (B): Suporte de acrílico posicionado sobre a plataforma de agitação do Biorreator WaveTM 42
- Figura 14. (A, B e C) Vista da plataforma com a Cellbag inserida no suporte para elevação das laterais e (D) vista lateral da plataforma com a Cellbag em posição normal de operação. As setas indicam o movimento dos microcarregadores no líquido. Em (C) os microcarregadores são impulsionados para a superfície inferior das extremidades da Cellbag e retornam para o líquido quando a plataforma inclina no sentido oposto (seta branca). Em (D) os microcarregadores são impulsionados para a superfície inferior das extremidades da Cellbag e não retornam para o líquido quando

- a plataforma inclina no sentido oposto, assim, forma-se uma zona de depósito de microcarregadores (região de encontro das setas branca e preta). 43
- Figura 15. Sistema utilizado para recuperação das CTM-CU ao término dos cultivos no Biorreator Wave™: 1) Passagem do meio de cultivo da Cellbag contendo os microcarregadores para o Frasco 1; 2) Passagem do meio de cultivo do Frasco 1 para o Frasco 2 através de membrana de 100 µm, para retenção dos microcarregadores no Frasco 1..... 47
- Figura 16. Comportamento do cultivo da CTM-CU com microcarregador CultiSpher-S® no Biorreator Wave™ sem modificação do formato da Cellbag. Cultivo com meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de CultiSpher-S® de 4,2 e 0,8 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 100 mL na adesão e de 500 mL no início da fase de expansão. 56
- Figura 17. Imagens dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica após aplicação do método MTT, evidenciando a presença das CTM-CU aderidas aos microcarregadores (regiões escuras sobre os microcarregadores), em cultivo com a Cellbag em posição normal de operação com (A) 24 h e (B) 168 h. Magnificação: 100x. 56
- Figura 18. (A) Representação do movimento da plataforma do biorreator com movimento ondulatório, com a Cellbag em posição normal de operação. Movimento no sentido horário (posição -1 para +1), levando à deposição de partículas na posição +1. Movimento no sentido anti-horário (posição +1 para -1), levando à deposição de partículas na posição -1. (B) Locais propensos à adesão dos microcarregadores, ao longo do cultivo da CTM-CU, indicados pelos retângulos em preto (depósito tipo duna) e em tracejado azul (depósito na superfície lateral - região de borda do líquido). (C e D) Depósito tipo duna de microcarregadores nas superfícies inferiores extremas da Cellbag, observado em cultivo com volume de 450 mL e agitação de 12 rpm/6°. (E) Depósito na superfície lateral observado em cultivo com volume de 470 mL e agitação de 14 rpm/8°. 57
- Figura 19. Curvas de concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo da Cellbag, operando com o novo formato, para determinação do k_{La} pelo método dinâmico. Condições de operação: 0,067 vvm, 24rpm/4° e aeração com ar..... 58
- Figura 20. Teste de molhabilidade para Cellbag antes do uso e Cellbag após cultivo da CTM-CU, com amostras retiradas da região central e região de borda do líquido (região lateral). Foi observada diferença estatística entre a Cellbag antes do uso e a Cellbag após cultivo da CTM-CU ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre a região central e a região de borda do líquido ($p > 0,05$). Legenda: H₂O: Água ultrapura; M: Meio de cultivo com 10% v/v SFB e MC: Meio Condicionado obtido no cultivo da CTM-CU. 60
- Figura 21. Imagens da interação entre gotícula de água ultrapura, logo após liberação, com a superfície interna da Cellbag para: (A) Cellbag antes do uso e (B) região central, (C) região de borda e (D) região central após tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, para Cellbag após cultivo da CTM-CU. Imagens após estabilização da gotícula para: (E) Cellbag antes do uso e (F) região central, (G) região de borda e (H) região central após tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, para Cellbag após cultivo da CTM-CU... 61
- Figura 22. Imagens da superfície interna da Cellbag obtidas por microscopia de força atômica: vista topográfica em 2D (A e C) e vista em relevo (B e D) da Cellbag antes do uso; vista topográfica em 2D (E e G) e vista em relevo (F e H) da Cellbag após cultivo da CTM-CU. 62
- Figura 23. Imagens da superfície interna da Cellbag, após cultivo da CTM-CU e tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, obtidas por microscopia de força atômica: vista

topográfica em 2D (A e C) e vista em relevo (B e D). Foi observada diferença estatística entre a rugosidade da Cellbag após cultivo da CTM-CU e as rugosidades da Cellbag antes do uso ($p = 0,05$) e após tratamento com tripsina-EDTA ($p = 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre a rugosidade da Cellbag antes do uso e após tratamento com tripsina-EDTA ($p > 0,05$). 63

Figura 24. Cultivo S1_{CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de CultiSpher-S[®] de 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 144 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores..... 65

Figura 25. Cultivo S2_{CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de CultiSpher-S[®] de 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 144 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores..... 66

Figura 26. Cultivo S1_{CS}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 67

Figura 27. Cultivo S2_{CS}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 68

Figura 28. Cultivo S1_{MAG}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de MAG de 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 7. Volume de trabalho de 150 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 168 e 216 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU..... 69

Figura 29. Cultivo S2_{MAG}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de MAG de 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 7. Volume de trabalho de 150 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 168 e 216 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU..... 70

Figura 30. Cultivo S1_{MAG}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 72

Figura 31. Cultivo S2_{MAG}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 72

Figura 32. Cultivo SW_{mod1CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator Wave[™] com 24 h. Concentração de CultiSpher-S[®] de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator Wave[™]. Condições de

operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.....	74
Figura 33. Cultivo SW _{mod1CS} : Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 192 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag.	75
Figura 34. Cultivo SW _{mod1CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.	76
Figura 35. Cultivo SW _{mod2CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α-MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator Wave™ com 24 h. Concentração de CultiSpher-S® de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator Wave™. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.....	77
Figura 36. Cultivo SW _{mod2CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.	78
Figura 37. Cultivo SW _{mod3CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α-MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator Wave™ com 24 h. Concentração de CultiSpher-S® de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator Wave™. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.....	79
Figura 38. Cultivo SW _{mod3CS} : Imagem do fundo da Cellbag com 240 h de operação (término do cultivo). Setas indicam agrupamentos de microcarregadores.....	80
Figura 39. Cultivo SW _{mod3CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.	81
Figura 40. Cultivo SW _{mod4CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α-MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator Wave™ com 24 h. Concentração de CultiSpher-S® de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator Wave™. Após 24 h (período operado no frasco spinner), adição de Pluronic-F68 ao meio de cultivo na concentração final de 0,1%. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.	82
Figura 41. Cultivo SW _{mod4CS} : Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 216 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag.	83

- Figura 42. Cultivo SW_{mod4CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 83
- Figura 43. Cultivo W_{mod1CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator Wave™. Concentração de CultiSpher-S® de 5,5 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 75 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida com agitação de 2rpm/2° durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores 85
- Figura 44. Cultivo W_{mod1CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 86
- Figura 45. Cultivo W_{mod2CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator Wave™. Concentração de CultiSpher-S® de 8,3 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores. 87
- Figura 46. Cultivo W_{mod2CS} : Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 240 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag. 88
- Figura 47. Cultivo W_{mod2CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 89
- Figura 48. Cultivo W_{mod3CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator Wave™. Concentração de CultiSpher-S® de 8,3 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 16. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores. 90
- Figura 49. Cultivo W_{mod3CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 91
- Figura 50. Cultivo W_{mod4CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator Wave™. Concentração de CultiSpher-S® de 25,0 e 2,1 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 6. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator Wave™;

- dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores. 92
- Figura 51. Cultivo W_{mod4CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 93
- Figura 52. Cultivo $W_{mod1MAG}$: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator Wave™. Concentração de MAG de 30,0 e 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 10. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU. 94
- Figura 53. Cultivo $W_{mod2MAG}$: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator Wave™. Concentração de MAG de 30,0 e 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 10. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator Wave™; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU. 95
- Figura 54. Cultivo $W_{mod1MAG}$: Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 144 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag. 96
- Figura 55. Cultivo $W_{mod1MAG}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 98
- Figura 56. Cultivo $W_{mod2MAG}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU. 98
- Figura 57. Análise de diferenciação das CTM-CU obtidas ao término dos cultivos em frasco Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}. Diferenciação em adipócitos evidenciada pela coloração com Sudan II. Diferenciação em osteócitos evidenciada pela coloração com nitrato de prata 5%. Diferenciação em condrócitos evidenciada pela coloração com Azul de alciano 1%. Magnificação: 100x (osteócitos e condrócitos) e 200x (adipócitos). 101
- Figura 58. Distribuição percentual de genes ligados às funções biológicas identificadas da CTM-CU com (A) regulação negativa e (B) regulação positiva, obtidas nos cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} , tendo como condição controle a CTM-CU expandida em modo 2D-estático. 103
- Figura 59. Distribuição de diâmetros das vesículas extracelulares coletadas ao término dos cultivos W_{mod3CS} , W_{mod4CS} , $S1_{MAG}$, $S2_{MAG}$, $W_{mod1MAG}$ e $W_{mod2MAG}$ e em cultivo da CTM-CU em modo 2D-estático. 117
- Figura 60. (A) Estimativa do número de vesículas extracelulares coletadas (0-1000 nm) por número de células ao término dos cultivos $S1_{MAG}$, $S2_{MAG}$, $W_{mod1MAG}$, $W_{mod2MAG}$, W_{mod3CS} e W_{mod4CS} , e em cultivo da CTM-CU em modo 2D-estático. (B) Estimativa do número de exossomos coletados (40-150 nm) por número de células ao

término dos cultivos S1 _{MAG} , S2 _{MAG} , W _{mod1} MAG, W _{mod2} MAG, W _{mod3} CS e W _{mod4} CS e em cultivo da CTM-CU em modo 2D-estático.	118
Figura 61. Fatores de expansão celular e concentração do inóculo obtidos na literatura sobre cultivo de CTM em biorreator com movimento ondulatório, e fatores de expansão celular e concentração do inóculo nos cultivos da CTM-CU no Biorreator Wave TM com o formato da Cellbag modificado (Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod}). Não foi observada diferença estatística entre os cultivos Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod} (p > 0,05). Relação do número de células inoculadas por microcarregador apresentada entre parênteses (cel/MC). (cel/MC*): valores estimados.	123
Figura 62. Nível máximo de LDH relativo (LDH/LDH _{inicial}) presente no meio de cultivo obtido nos cultivos da CTM-CU realizados em frasco Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod}	124
Figura 63. Imagens dos microcarregadores após aplicação do método MTT evidenciando a presença da CTM-CU aderida aos microcarregadores através da formação dos cristais de formazan (regiões escuras sobre os microcarregadores), ao término dos cultivos Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod} . Magnificação: 100x para todas as imagens, exceto para S2 _{MAG} e W _{mod3} CS, com 200x.	125
Figura 64. Perfil do consumo de glicose e produção de lactato pela CTM-CU nos cultivos Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod}	127
Figura 65. Dados do diâmetro médio de partículas (microcarregadores e agregados de microcarregadores) durante os cultivos Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod} . A linha em preto representa o diâmetro médio dos microcarregadores CultiSpher-S [®] sem células, após hidratação em PBS e autoclavagem. A linha em verde representa o diâmetro médio dos microcarregadores MAG sem células, após hidratação em soro fisiológico e autoclavagem.	128
Figura 66. Estimativa do número total de vesículas extracelulares obtidas ao término dos cultivos S1 _{MAG} , S2 _{MAG} , W _{mod1} MAG, W _{mod2} MAG, W _{mod3} CS e W _{mod4} CS. Volumes de operação: 150 mL (spinner) e 600 mL (Biorreator Wave TM). Dose clínica estimada em 2,5 x 10 ¹² VEs/dose.	131
Figura 67. Produtividade celular obtida nos cultivos da CTM-CU em frasco spinner e no Biorreator Wave TM . A linha em preto representa a produtividade celular média obtida em cultivos da CTM-CU em modo 2D-estático.	134
Figura 68. Estimativa do número de doses clínicas obtidas nos cultivos realizados em frasco Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod} , considerando bioprocessamento de coleta e estocagem das CTM-CU expandidas com eficiência de 65%. Volumes de operação: 200 mL (spinner _{CS}), 150 mL (spinner _{MAG}) e 600 mL (Biorreator Wave TM). Exemplos de possibilidade de aplicação clínica para: 6,5x10 ⁷ cel/dose (GvHD, Esclerose múltipla e doença de Crohn); 2,0x10 ⁷ cel/dose (Esclerose múltipla e doença de Crohn).	136
Figura 69 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo S1 _{CS} . Equação de ajuste y = -2,383E7x ² +9,617E6x, com coeficiente de determinação de 0,995.	151
Figura 70 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivos S2 _{CS} e W _{mod3} CS. Equação de ajuste y = -7,161E7x ² +1,666E7x, com coeficiente de determinação de 0,989.	151
Figura 71 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivos SW _{mod1} e SW _{mod2} . Equação de ajuste y = -8,12E6x ² +5,74E6x+3,87E4 com coeficiente de determinação de 0,994.	152
Figura 72 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivos SW _{mod3} e SW _{mod4} . Equação de ajuste y = -1,34E7x ² +7,01E6x+5,8E4, com coeficiente de determinação de 0,986.	152

Figura 73 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo W_{mod1CS} . Equação de ajuste $y = -1,98577E7x^2+8,78482E6x$, com coeficiente de determinação de 0,995. 153

Figura 74 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo W_{mod2CS} . Equação de ajuste $y = -5.21E7x^2+1.41439E7x$, com coeficiente de determinação de 0,989. 153

Figura 75 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo W_{mod4CS} . Equação de ajuste $y = -2,47E6x^2+3,24E6x$, com coeficiente de determinação de 0,989. 154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de biorreatores empregados no cultivo de Células-Tronco Mesenquimais e Fatores de expansão celular obtidos.	21
Tabela 2. Modelos de microcarregadores para cultivo de células dependentes de ancoramento.	24
Tabela 3. Condições de operação utilizadas nos cultivos da CTM-CU realizados em frasco Spinner, sistema Spinner- Biorreator Wave™ e no Biorreator Wave™, com o formato da Cellbag modificado.	40
Tabela 4. Resultados da análise de imunofenotipagem da CTM-CU na condição anterior aos cultivos e obtida ao término dos cultivos em frasco Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod}	100
Tabela 5. Relação dos 50 genes com menor regulação negativa após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador CultiSpher-S®.	104
Tabela 6. Relação dos 50 genes com menor regulação negativa após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador MAG.	106
Tabela 7. Relação dos 50 genes com menor regulação negativa após cultivo da CTM-CU no Biorreator Wave™ com microcarregador CultiSpher-S®.	108
Tabela 8. Relação dos 50 genes com maior regulação positiva após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador CultiSpher-S®.	110
Tabela 9. Relação dos 50 genes com maior regulação positiva após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador MAG.	112
Tabela 10. Relação dos 50 genes com maior regulação positiva após cultivo da CTM-CU no Biorreator Wave™ com microcarregador CultiSpher-S®.	114
Tabela 11. Porcentagem de partículas com diâmetro inferior a 0,300 mm ao término dos cultivos realizados em frasco Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod}	129
Tabela 12. Resultados obtidos nos cultivos da CTM-CU realizados em Spinner, sistema Spinner-Wave™ e Biorreator Wave™.	137
Tabela 13. Dados do cultivo S1 _{CS}	155
Tabela 14. Dados do cultivo S2 _{CS}	156
Tabela 15. Dados do cultivo S1 _{MAG}	157
Tabela 16. Dados do cultivo S2 _{MAG}	158
Tabela 17. Dados do cultivo SW _{mod} 1 _{CS}	159
Tabela 18. Dados do cultivo SW _{mod} 2 _{CS}	160
Tabela 19. Dados do cultivo SW _{mod} 3 _{CS}	161
Tabela 20. Dados do cultivo SW _{mod} 4 _{CS}	162
Tabela 21. Dados do cultivo W _{mod} 1 _{CS}	163
Tabela 22. Dados do cultivo W _{mod} 2 _{CS}	164
Tabela 23. Dados do cultivo W _{mod} 3 _{CS}	165
Tabela 24. Dados do cultivo W _{mod} 4 _{CS}	166
Tabela 25. Dados do cultivo W _{mod} 1 _{MAG}	167
Tabela 26. Dados do cultivo W _{mod} 2 _{MAG}	168

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D: Cultivos bidimensionais

3D: Cultivos tridimensionais

ATP: Adenosina trifosfato (*Adenosine TriPhosphate*)

BPF: Boas Práticas de Fabricação (*GMP - Good Manufacturing Practice*)

CHO: Células de ovário de hamster chinês (*Chinese Hamster Ovary*).

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC - High-Performance Liquid Chromatography*)

CS: Microcarregador CultiSpher-S®

CTMs: Células-Tronco Mesenquimais

CTM-CU: Células-Tronco Mesenquimais humanas provenientes de Cordão Umbilical

DMSO: Dimetilsulfóxido - (CH₃)₂SO

EDC: N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride

EVA/LDPE: Ethylene Vinyl Acetate/Low Density Polyethylene (Etileno-acetato de vinila /Polietileno de Baixa Densidade)

FC: variação na expressão gênica de um dado gene (*Fold Change*)

FDA: Food and Drug Administration

FE: Fator de Expansão celular

HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)

hMSC-GFP: Linhagem human Mesenchymal Stem Cells com expressão da proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

hMSC-TERT: Linhagem human Mesenchymal Stem Cells imortalizada pela Telomerase Reverse Transcriptase

hUCM-MSC: human Umbilical Cord Matrix derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells

hpMSC: human placental Mesenchymal Stem Cells

iPSC: induced Pluripotent Stem Cells

LATECC: Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (DEQ - UFSCar)

MAG: Microcarregador de Alginato e Gelatina desenvolvido no LATECC

MC: Microcarregador

MFA: Microscopia de Força Atômica

MSC: Mesenchymal Stem/Stromal Cell

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

NASA: National Aeronautics and Space Administration

PBS: Solução tampão de fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)

S2: *Drosophila melanogaster* S2

SFB: Soro Fetal Bovino

Sistema 2/10: Plataforma de operação do Biorreator Wave™ com capacidade de trabalho com Cellbags de 2 e 10 L

SUS: Sistema de Uso Único (*Single-Use System*)

SW_{mod}: Cultivos com fase de adesão em frasco spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™ com o formato da Cellbag modificado (cultivos SW_{mod})

VEs: Vesículas Extracelulares

Vero: linhagem celular originária de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (African green monkey kidney)

W_{mod}: Cultivos com fase de adesão e fase de expansão no Biorreator Wave™ com o formato da Cellbag modificado (cultivos W_{mod})

W_{normal}: Cultivos com fase de adesão e fase de expansão no Biorreator Wave™ sem alteração na Cellbag (cultivos W_{normal})

wt-hMSC: Wild type - human Mesenchymal Stem/Stromal Cells (Linhagem primária)

α-MEM: Alpha-Minimum Essential Medium

LISTA DE SÍMBOLOS

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

arg: arginina

B: largura da Cellbag (m)

C: fator de correção considerando o modelo de Cellbag, ângulo e agitação da plataforma e volume de operação

células/MC: Número de células por microcarregador

glc: glicose

gln: glutamina

h: altura de líquido na Cellbag (m)

k: agitação da plataforma (rpm)

$k_L a$: coeficiente de transferência de oxigênio (h^{-1})

lac: lactato

N_{S1U} : agitação mínima da plataforma para suspensão de partículas (rpm)

Re_{mod} : número de Reynolds modificado

t_d : tempo de duplicação celular (h)

V: volume de operação (m^3)

ν : viscosidade cinemática ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xx
LISTA DE SÍMBOLOS	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Células-Tronco Mesenquimais - CTMs	5
2.1.1. Crescimento e Metabolismo	8
2.1.2. A expressão gênica das CTMs em cultivo	11
2.1.3. Liberação de Fatores Bioativos e Vesículas Extracelulares pelas CTMs em cultivo	13
2.2. Expansão de Células-Tronco Mesenquimais	15
Biorreator Spinner	17
Biorreator de Tanque Agitado	18
Biorreator de Paredes Rotativas	18
Biorreator de Vórtice de Taylor	19
Biorreator de Fibra Oca	19
Biorreator com Movimento Ondulatório (<i>Rocking Motion</i> ou <i>Wave-induced Motion Bioreactor</i>)	19
2.2.1. Cultivo de CTMs em 3D	22
Superfícies para ancoramento - Microcarregadores (MCs)	22
Agregados de células	23
2.3. Biorreator com Movimento Ondulatório	25
Agitação Mínima para Suspensão de Partículas	26
Regime de Agitação e Potência Dissipada	27
2.4. Considerações Finais	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Visão geral do trabalho experimental	32
4.2. Célula-Tronco Mesenquimal utilizada nesta tese	34

4.3.	Procedimento típico seguido na realização dos cultivos da CTM-CU	34
4.3.1.	Descongelamento e ativação da CTM-CU	34
4.4.	Condições utilizadas nos cultivos da CTM-CU no Biorreator Wave™ e em frasco Spinner	35
4.4.1.	Cultivos no Biorreator Wave™	36
4.4.1.1.	<i>Cultivos Wave_{normal}</i>	36
4.4.1.2.	<i>Cultivos Spinner-Wave_{mod}</i>	36
4.4.1.3.	<i>Cultivos Wave_{mod}</i>	36
4.4.2.	Cultivos em frasco Spinner	37
4.4.2.1.	<i>Cultivos S1_{CS} e S2_{CS}</i>	37
4.4.2.2.	<i>Cultivos S1_{MAG} e S2_{MAG}</i>	37
4.5.	Cellbag inserida dentro do suporte para evitar segregação dos microcarregadores	41
4.6.	Determinação do nível de depósito de microcarregadores	41
4.7.	Determinação do coeficiente de transferência de oxigênio - $k_L a$	41
4.8.	Ângulo de contato – Teste de molhabilidade	44
4.9.	Microscopia de Força Atômica - MFA	44
4.10.	Preparação dos microcarregadores (MCs)	45
4.10.1.	Microcarregador CultiSpher-S®	45
4.10.2.	Microcarregador a base de Alginato e Gelatina - MAG	45
4.11.	Quantificação da densidade e viabilidade celular	45
4.11.1.	Quantificação de células viáveis pelo método MTT	46
4.12.	Procedimentos de recuperação das CTM-CU aderidas aos microcarregadores ao término dos cultivos	47
4.13.	Quantificação de lise celular pelo método LDH	48
4.14.	Análise de glicose e lactato	48
4.15.	Análise de amônia	48
4.16.	Análise de aminoácidos	48
4.17.	Diâmetro médio de microcarregadores isolados ou agregados de microcarregadores	49
4.18.	Análise de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos	49
4.19.	Análise de Imunofenotipagem	49
4.20.	Análise de padrões de expressão gênica global por ensaios do tipo <i>microarrays</i>	50
4.21.	Análise da concentração e distribuição de tamanhos de vesículas extracelulares no meio condicionado derivado da CTM-CU	51
4.22.	Equacionamentos	52

4.23.	Análise estatística.....	53
5.	RESULTADOS	54
5.1.	Caracterização dos problemas operacionais identificados no Biorreator Wave™ durante o cultivo da CTM-CU.....	54
5.2.	Coeficiente de transferência de oxigênio dissolvido – Potência Dissipada....	58
5.3.	Análise da superfície interna da Cellbag: Ângulo de contato e Microscopia de Força Atômica.....	59
5.4.	Cultivos controle da CTM-CU em frasco Spinner - Cultivos S1 _{CS} , S2 _{CS} , S1 _{MAG} e S2 _{MAG}	64
	Adesão e expansão em frasco Spinner	64
	Cultivos S1 _{CS} e S2 _{CS}	64
	Cultivos S1 _{MAG} e S2 _{MAG}	68
5.5.	Cultivos da CTM-CU com fase de adesão em frasco Spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™ - Cultivos SW _{mod1CS} , SW _{mod2CS} , SW _{mod3CS} e SW _{mod4CS}	73
	Análise da fase de adesão em frasco spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™	73
	Cultivo SW _{mod1CS}	73
	Cultivo SW _{mod2CS}	76
	Cultivo SW _{mod3CS}	79
	Cultivo SW _{mod4CS}	81
5.6.	Cultivos da CTM-CU com fase de adesão e fase de expansão realizadas no Biorreator Wave™ - Cultivos W _{mod1CS} , W _{mod2CS} , W _{mod3CS} , W _{mod4CS} , W _{mod1MAG} e W _{mod2MAG}	84
	Adesão e expansão no Biorreator Wave™	84
	Cultivo W _{mod1CS}	84
	Cultivo W _{mod2CS}	86
	Cultivo W _{mod3CS}	89
	Cultivo W _{mod4CS}	91
	Cultivos W _{mod1MAG} e W _{mod2MAG}	94
5.7.	Avaliação dos requisitos de qualidade da CTM-CU ao término dos cultivos .	99
	Diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos.....	99
	Imunofenotipagem	99
	Padrões de expressão gênica global da CTM-CU coletada dos cultivos em Biorreator Wave™ e frasco Spinner.....	102
5.8.	Vesículas extracelulares coletadas do meio condicionado derivado da CTM-CU nos cultivos em Biorreator Wave™ e frasco Spinner	116
6.	DISCUSSÃO.....	119

6.1.	Problemas enfrentados no cultivo da CTM-CU em biorreator com movimento ondulatório - Depósitos de Microcarregadores na Cellbag.....	119
6.2.	Perfil de crescimento da CTM-CU e Fatores de Expansão Celular	121
6.3.	Metabolismo da CTM-CU	126
6.4.	Distribuição do diâmetro de partículas durante os cultivos da CTM-CU.....	127
6.5.	Vesículas Extracelulares coletadas nos cultivos da CTM-CU.....	130
6.6.	Expressão gênica da CTM-CU obtida nos cultivos em Biorreator Wave™ e frasco Spinner – Regulação da matriz extracelular e Atividade imunomoduladora	132
6.7.	Potencial de aplicação em escala clínica do bioprocesso de cultivo da CTM-CU em biorreator com movimento ondulatório com modificação do formato da Cellbag	133
7.	CONCLUSÕES	138
8.	SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	140
	REFERÊNCIAS	141
	Apêndice 1. Curva padrão da análise de células viáveis pelo método MTT.	151
	Apêndice 2. Dados dos cultivos Spinner, Spinner-Wave _{mod} e Wave _{mod} : número de células aderidas aos microcarregadores; concentração de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia; porcentagem de CO ₂ ; pH; agitação e lista dos aminoácidos com consumo superior à 60%.	155

1. INTRODUÇÃO

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) estão sendo intensivamente avaliadas no mundo inteiro no tratamento de doenças imunológicas e degenerativas, devido ao seu potencial de promoção de angiogênese, diferenciação (ANKRUM; KARP, 2010; WEI et al., 2013) e imunomodulação (ANKRUM; KARP, 2010; COSTA et al., 2018; KATSUDA et al., 2013; KAY et al., 2017; WEI et al., 2013). Além de serem aplicadas em terapia celular, as CTMs apresentam grande importância no desenvolvimento de novos biofármacos (ESCH; BAHINSKI; HUH, 2015; KITAMBI; CHANDRASEKAR, 2011). As Vesículas Extracelulares (VEs) liberadas pelas CTMs no meio de cultivo também estão sendo alvo de pesquisas visando aplicação terapêutica, por conterem material bioativo e atuarem na comunicação intercelular (RAPOSO; STORVOGEL, 2013; WILLMS et al., 2018). Segundo dados da BCC Research (Business Communications Company Inc.), o mercado mundial de aplicações terapêuticas com CTMs apresenta expectativa de crescimento para 12,3 bilhões de dólares em 2021 (BCC RESEARCH, 2016), o que coloca em evidência o interesse e prestígio dessas células na medicina moderna.

As pesquisas com CTMs deram os primeiros passos na década de 1960, através do cientista russo Alexander Friedenstein, com estudos acerca das células obtidas da medula óssea e sua capacidade de diferenciação em osteócitos (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966). O termo mesenchymal stem cell (MSC) foi introduzido por Caplan (1991), em trabalho que mostrou o potencial de reparação de tecido pelas CTMs (CAPLAN, 1991). Como exemplos de fontes de CTMs, tem-se a placenta (TIMMINS et al., 2012), o tecido adiposo, cordão umbilical e medula óssea (PLACZEK et al., 2009). As CTMs estão sendo avaliadas para tratamento de doenças como diabetes, da coluna vertebral, oculares, cardíacas, de Crohn e Parkinson (TROUNSON; MCDONALD, 2015). As CTMs são visadas nos tratamentos citados pelo potencial de diferenciação e de atuação parácrina, liberando fatores de sinalização celular, importantes na imunoregulação e regeneração de microambientes lesados (CAPLAN; DENNIS, 2006; REN et al., 2010).

Fontes importantes de Células-Tronco como o cordão umbilical e a medula óssea, fornecem Células-Tronco Mesenquimais adultas, multipotentes, com capacidade de diferenciação em linhagens celulares de tecidos como osso, cartilagem, tendão, músculo e gordura (CAPLAN, 2007). As Células-Tronco embrionárias obtidas do blastocisto são pluripotentes, com capacidade de diferenciação em tipos celulares

derivados das três camadas germinativas (endoderma, ectoderma e mesoderma) (FERNANDES et al., 2014), contudo sem capacidade de originar um indivíduo.

Além desses dois tipos de Células-Tronco, existem as Células-Tronco pluripotentes induzidas – *induced pluripotent stem cell* - iPSC. A tecnologia para obtenção da iPSC foi desenvolvida pelos cientistas japoneses Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka em 2006, em trabalho que estudou a reprogramação de células adultas de pele em células pluripotentes capazes de originarem linhagens celulares autólogas das três camadas germinativas, assim como as Células-Tronco embrionárias, e com reduzido risco de rejeição pelo paciente (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Existe grande expectativa de aplicações das iPSCs, especialmente na área de testes farmacológicos e terapias clínicas personalizadas (GRSKOVIC et al., 2011; INOUE et al., 2014; ROBINSON; DALEY, 2012). Contudo, há controvérsias quanto aos mecanismos do processo de reprogramação, os quais ainda não estão bem elucidados (FERNANDES et al., 2014; ZHANG et al., 2012). A aplicabilidade das Células-Tronco embrionárias envolve questões éticas e sobre os riscos de rejeição pelo indivíduo receptor, já que consiste de um tratamento alogênico (ZWI-DANTSIS; GEPSTEIN, 2012). O emprego de CTMs adultas não apresenta questões éticas e, além disso, podem ser obtidas do próprio paciente (tratamento autólogo), com baixo risco de rejeição (ESTRONCA; FERREIRA, 2016).

O número de células nas doses clínicas utilizadas em terapia celular com CTMs varia de 1-100 milhões ou mais (BOS et al., 2014). Como exemplos do elevado número de células requerido, são necessárias cerca de 20-200 milhões de células por dose para aplicação em doenças cardíacas (HARE et al., 2009), para doença de Crohn, cerca de 65-1200 milhões de células por dose (GAO et al., 2016). Na medula óssea, entre 0,001 e 0,01% do total de células aspiradas são CTMs (PITTINGER et al., 1999). Para o cordão umbilical, o número de CTMs isoladas varia entre 1-5 milhões de células por cordão umbilical (MIZUKAMI et al., 2018). Assim, para ser possível empregar as CTMs em estudos clínicos e em terapia celular, é necessário aumentar a produção *in vitro* (SANTOS et al., 2013). O uso da tecnologia de biorreatores para tal fim é sugerido consensualmente por especialistas da academia e indústria para viabilizar o atendimento das grandes demandas esperadas de CTMs em aplicações clínicas (FERNANDES et al., 2014; ROWLEY et al., 2012; SART et al., 2016; SCHNITZLER et al., 2016).

O emprego de biorreatores descartáveis e pré-esterilizados, geralmente por radiação gama, conhecidos como Sistemas de Uso Único - SUS (*Syngle-use Systems*), é visto como uma alternativa para o cultivo de células animais para fins de

pesquisa científica e aplicações em bioprocessos. Atualmente, essa tecnologia de sistemas descartáveis está presente em várias aplicações de cultivo de células, como os frascos de cultura, assim como em biorreatores e dispositivos para filtração e recuperação de células. Segundo a BCC Research, o mercado de produtos com tecnologia *single-use* aplicada à indústria biofarmacêutica deve atingir aproximadamente 4,3 bilhões de dólares em 2021 (BCC RESEARCH, 2017).

Com o uso da tecnologia *single-use*, as indústrias de biotecnologia adquirem maior flexibilidade para alterar as linhas de produção e podem operar com plantas que requerem menor espaço físico. O capital investido para construção da planta é menor com relação à tecnologia tradicional de biorreatores, normalmente apresentam menor custo nas instalações para limpeza e esterilização. Além disso, os processos estão sujeitos a menores riscos de contaminação e sua validação pelas agências reguladoras é mais simples (EIBL; EIBL; PETRA KOHLER, 2012; SHUKLA; GOTTSCHALK, 2013). Contudo, a tecnologia *single-use* apresenta limitações no que se refere ao limite máximo de escalonamento (*scale-up*), o qual atualmente chega a 4.000 L para os biorreatores comercializados pela empresa ABEC® e 2.000 L para os biorreatores das empresas GE Healthcare®, Pall® e Thermo Scientific®. Outros inconvenientes que precisam ser superados são o baixo número de fornecedores e a falta de padronização entre produtos de diferentes marcas (SHUKLA; GOTTSCHALK, 2013). Os custos de descarte do material sólido gerado e a questão ambiental ligada ao uso de material plástico descartável são compensados pela economia de energia, água e produtos químicos, recursos que apresentam maior consumo em bioprocessos com biorreatores do sistema tradicional (GOTTSCHALK, 2009).

O biorreator com movimento ondulatório - Biorreator Wave™ é um exemplo de biorreator que utiliza tecnologia SUS. Lançado no mercado no fim da década de 1990 como um biorreator muito promissor para cultivo de células, vem sendo empregado para expansão de células de plantas e animais, e sugerido por Singh (1999) como viável para células com crescimento em suspensão e para células dependentes de ancoramento (SINGH, 1999). O Biorreator Wave™ da GE Healthcare é constituído por uma plataforma com balanço vertical que induz movimento unidirecional em forma de ondas no meio de cultivo contendo células, ambos condicionados dentro de uma bolsa plástica descartável, e pré-esterilizada, com formato de “travesseiro”, conhecida como Cellbag.

Apesar de haver vasta literatura acerca do cultivo de CTMs™, estudos de revisão da literatura apresentam que são poucos os trabalhos aplicando biorreatores com movimento ondulatório para expansão de células-tronco (KUMAR; STARLY, 2015;

PINTO; DA SILVA; CABRAL, 2018; SANTOS et al., 2013). Precisamente, são apenas três trabalhos, apresentados por Åkerström em 2009, Timmins e colaboradores em 2012 e Jossen e colaboradores em 2016. Contudo, tais estudos não fornecem informações detalhadas acerca dos procedimentos operacionais e problemas encontrados durante o cultivo de CTMs (ÅKERSTRÖM, 2009; JOSSEN et al., 2016; TIMMINS et al., 2012).

Os problemas operacionais mais relevantes do biorreator com movimento ondulatório no cultivo de CTMs podem ser assim resumidos: 1) Fase de adesão ineficiente das CTMs aos microcarregadores e consequente perda celular por morte; 2) Depósito gradual das partículas (microcarregadores com CTMs aderidas) na superfície inferior das extremidades da Cellbag e na superfície lateral da Cellbag (na região de borda líquido-gás), devido ao movimento ondulatório unidirecional imposto ao líquido. O efeito disto também leva à perda celular por morte.

Dentre os três trabalhos que estudaram o cultivo de CTMs em biorreator com movimento ondulatório, apenas Timmins e colaboradores (2012) realizaram a fase de adesão das CTMs aos microcarregadores dentro da Cellbag, o que evidencia a dificuldade de efetuar essa importante fase do cultivo no próprio biorreator. O problema de formação de depósitos de partículas é relatado em trabalho sobre cultivo de iPSC no Biorreator Wave™ (ESPINHA, 2014). Informações pessoais fornecidas por usuários e fornecedores do Biorreator Wave™, e constatações experimentais no LATECC (Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares - LATECC, Departamento de Engenharia Química da UFSCar), sugerem que alguns procedimentos de cultivo e o escoamento do líquido na Cellbag precisam ser modificados para melhorar o desempenho desse biorreator no cultivo de CTMs.

Diante do cenário exposto, o desenvolvimento aprimorado de processos de cultivo das CTMs em biorreator com movimento ondulatório constituem grande desafio para a Engenharia de Bioprocessos. Na presente tese foram identificados os principais problemas que limitam a expansão das CTMs utilizando o Biorreator Wave™. Para contornar os problemas identificados, foram realizadas mudanças de metodologias de cultivo e modificações geométricas da Cellbag, visando cultivos de CTMs que conduzam a fatores de expansão celular semelhantes aos de outros sistemas de cultivo bem consolidados no âmbito acadêmico e industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão apresentados levantamentos bibliográficos acerca das características das Células-Tronco Mesenquimais, como perfil de crescimento em cultivo, metabolismo, expressão gênica e liberação de fatores bioativos. Também serão apresentados modelos de biorreatores aplicados ao cultivo de CTMs, assim como formas de cultivo em 3D. Por fim, serão apresentadas, em maior detalhamento, as características do biorreator com movimento ondulatório e a aplicação do mesmo em cultivo com CTMs.

2.1. Células-Tronco Mesenquimais - CTMs

Áreas clínicas como cardiologia, imunologia, neurologia e oftalmologia, estão impulsionando as pesquisas científicas com Células-Tronco Mesenquimais - CTMs (TROUNSON; MCDONALD, 2015). As Células-Tronco Mesenquimais são encontradas em diferentes tecidos, dentre eles destacam-se a placenta (TIMMINS et al., 2012), tecido adiposo, cordão umbilical e medula óssea (PLACZEK et al., 2009). Na medula óssea, entre 0,001 e 0,01% do total de células aspiradas são Células-Tronco Mesenquimais, dependendo da idade do doador, havendo maior população de CTMs em doadores jovens (PITTENGER et al., 1999). Com o cordão-umbilical é possível obter entre 1-5 milhões de CTMs por cordão (MIZUKAMI et al., 2018).

Assim, para obterem-se as doses clínicas necessárias, é preciso um longo período de cultivo, acarretando em alto número de manipulações e grande demanda de recursos (SANTOS et al., 2013). Para que a elaboração de novas técnicas de tratamento envolvendo CTMs se torne realidade e a aplicação terapêutica seja possível, é necessário desenvolver sistemas de cultivo seguros e eficientes, que possibilitem obtenção de elevado número de CTMs mantendo as características funcionais das células.

As CTMs são células tipicamente dependentes de ancoramento, para serem expandidas em cultivo é necessária uma superfície para adesão. Também podem ser cultivadas em forma de agregados celulares (SART et al., 2014). São células muito sensíveis às condições de cultivo. Sendo a própria CTM o produto de interesse, deve-se ter especial cuidado com o processo de cultivo, para que a célula não sofra alterações que inviabilizem a aplicação terapêutica. No desenvolvimento de processos para aumento de escala de produção, as sucessivas etapas de subcultura (passagem das células), por exemplo, acarretam em danos às células, ou seja, as técnicas de

cultivo devem priorizar a maior densidade celular em menor número de subculturas possível (HEWITT et al., 2011).

Com relação ao potencial de diferenciação em diferentes tipos celulares, as Células-Tronco podem ser divididas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células do zigoto são consideradas totipotentes devido ao potencial de formação de um indivíduo completo. As Células-Tronco embrionárias são células pluripotentes por apresentarem capacidade de diferenciação em qualquer tipo celular. As Células-Tronco adultas estão presentes em tecidos e órgãos, são células indiferenciadas, multipotentes, com capacidade de diferenciação mais limitada comparada às Células-Tronco embrionárias (NIRMALANANDHAN; SITTAMPALAM, 2009). As Células-Tronco adultas presentes na medula óssea são divididas em dois grupos: células hematopoiéticas (células sanguíneas) e células não hematopoiéticas (Células-Tronco Mesenquimais - CTMs) (NIRMALANANDHAN; SITTAMPALAM, 2009). Apesar de existirem outras fontes de CTMs, a CTM derivada da medula óssea permanece sendo a mais rigorosamente estudada e com maior aplicação em estudos clínicos (PANCHALINGAM et al., 2015).

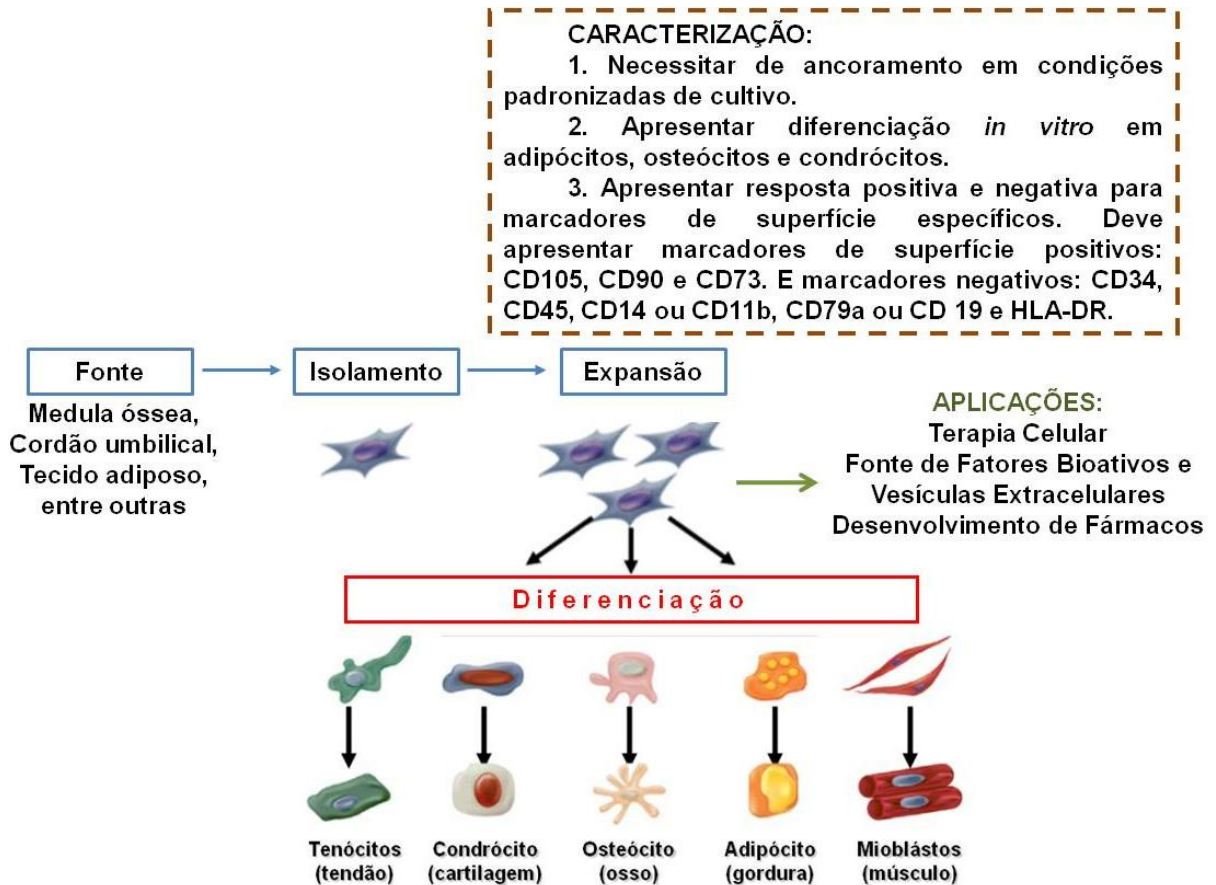
A aplicação das CTMs para tratamento de enfermidades em diferentes áreas clínicas está relacionada à sua capacidade de expansão, diferenciação *in vitro* em células especializadas e atividade imunomoduladora (Figura 1). O potencial de regeneração de tecidos das CTMs provém de sua capacidade de diferenciação (PLACZEK et al., 2009) e também da liberação de fatores bioativos ao microambiente lesado (CAPLAN, 2007). Dentre os fatores bioativos secretados pelas CTMs, destacam-se fatores de crescimento, com ação imunorreguladora, anti-inflamatória, anti-apoptótica, anti-oxidante e pró-angiogênese. (MARTIN et al., 2017).

A capacidade de deslocamento das CTMs *in vivo*, conhecida como *homing*, é igualmente importante para a ação terapêutica no local desejado (CHAMBERLAIN et al., 2007; KATSUDA et al., 2013). Várias quimiocinas estão relacionadas aos processos de deslocamento das CTMs no ambiente *in vivo* para regiões que estejam liberando sinais que demonstram funcionamento desregulado ou lesões (CHAMBERLAIN et al., 2007). Estudos mostraram que as CTMs expressam um grande grupo de citocinas responsáveis pelo recrutamento de células de defesa, como macrófagos, neutrófilos, células T e B (LIN; DU, 2018). Além disso, a aplicação de terapias com CTMs adultas não envolve questões éticas, como no caso do emprego de Células-Tronco embrionárias.

Para garantir um padrão de qualidade terapêutica mínimo ao final do processo de expansão *in vitro*, recomenda-se verificação da manutenção de algumas características das CTMs. Utilizando-se os três critérios seguintes (DOMINICI et al., 2006):

1. Necessitar de ancoramento em condições padronizadas de cultivo.
2. Apresentar diferenciação *in vitro* em adipócitos, osteócitos e condrócitos.
3. Apresentar resposta positiva e negativa para marcadores de superfície específicos. Deve apresentar marcadores de superfície positivos: CD105, CD90 e CD73. E marcadores negativos: CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR.

Figura 1. Processo simplificado apresentando o potencial de expansão e de diferenciação das Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) e os itens para caracterização das CTMs.



Adaptado de (GULDE; CAMPBELL; VEMURI, 2016).

2.1.1. Crescimento e Metabolismo

As células animais apresentam número limite de divisões mitóticas devido ao encurtamento dos telômeros, capas de proteção localizadas nas extremidades dos cromossomos, após cada processo de divisão (BUTLER, 2004). A capacidade de subcultura (passagem) das CTMs primárias é dependente da idade do doador. Em doadores jovens o potencial para subcultura gira em torno de 40 passagens, enquanto para doadores com mais idade, esse número cai para cerca de 24 passagens (ABDALLAH; KASSEM, 2007). Conforme apresentado no item anterior (2.1.), deve-se ter devida atenção à senescência das células, ou seja, ao número máximo de passagens da linhagem em uso, pois a morfologia celular e características funcionais sofrem alterações ao longo dos processos de subcultura.

As células provenientes de linhagem primária que passam por processo de imortalização originam linhagem contínua, sendo denominadas células imortalizadas por apresentarem potencial infinito de subdivisões. O processo de imortalização acontece a partir da sobre-expressão da enzima telomerase que atua estendendo a capacidade de divisão celular (ABDALLAH; KASSEM, 2007).

O cultivo de células apresenta quatro fases características, sendo elas a Fase lag, Fase de crescimento exponencial, Fase estacionária e Fase de declínio (Figura 2).

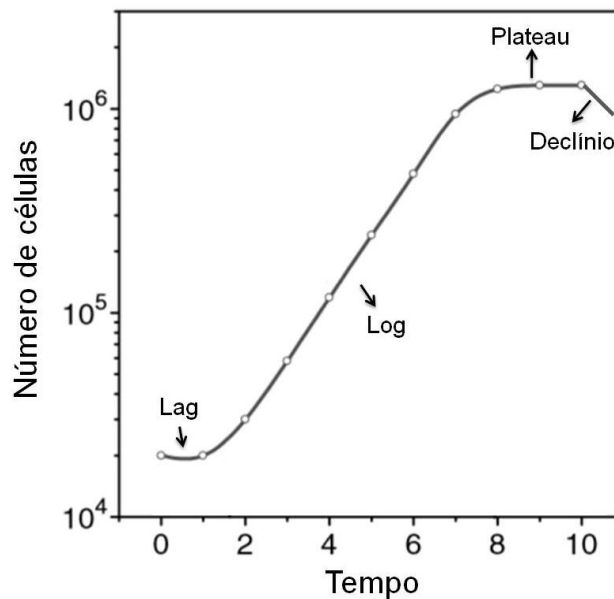
Fase Lag - corresponde à fase inicial do cultivo e é especialmente relacionada à concentração do inóculo. Em geral, quanto menor a concentração celular inoculada, maior a duração da fase lag. Trata-se de um período de adaptação das células às condições de cultivo, em que as células liberam fatores de crescimento que devem atingir um nível mínimo de concentração para que a fase de crescimento exponencial seja alcançada.

Fase de crescimento exponencial - durante a fase de crescimento exponencial as células estão no auge de sua capacidade metabólica e apresentam a maior velocidade de crescimento.

Fase estacionária - corresponde ao período em que não há aumento da densidade celular, relacionada às condições de cultivo, como limitação de nutrientes, elevação da concentração de metabólitos tóxicos e ausência de área para expansão. Nesse período, a velocidade de crescimento se iguala à velocidade de morte celular.

Fase de declínio - corresponde ao período em que a viabilidade do cultivo decai, estando relacionado aos processos de morte por necrose ou apoptose (BUTLER, 2004; FRESHNEY, 2010).

Figura 2. Fases típicas presentes no cultivo de células animais.



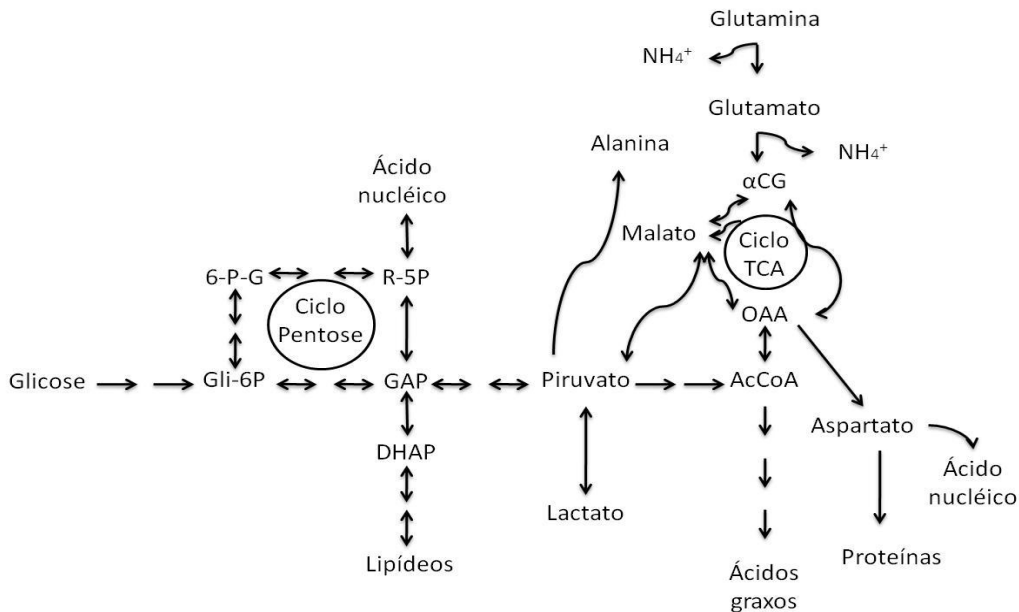
Adaptado de (FRESHNEY, 2010).

As células animais cultivadas *in vitro* apresentam alterações significativas nas funções metabólicas, por serem adaptadas a um ambiente diferente do encontrado *in vivo*. O processo de imortalização da linhagem primária também resulta em interferência direta nas vias metabólicas. A célula consome fontes de carbono e nitrogênio em excesso, resultando em maior produção de metabólitos inibidores do crescimento celular vinculados às vias de consumo dessas fontes (AMABLE; BUTLER, 2008). Em geral, glicose corresponde à principal fonte de carbono e energia para as células e a glutamina a principal fonte de nitrogênio e também de carbono, em caso de ausência de glicose. Lactato e amônia são os metabólitos com maior potencial de inibição do cultivo, dependendo do nível de concentração, por ter como ação principal alterar o pH intracelular (SHULER; KARGI, 2002). Dentre as várias vias metabólicas necessárias para o crescimento e manutenção celular, destacam-se as vias de consumo de glicose e consumo de glutamina e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) (SCHOP et al., 2009).

De modo simplificado, a glicose é convertida em piruvato através da glicólise e também empregada para síntese de biomassa através da via pentose-fosfato. O piruvato é parcialmente convertido em CO_2 e água através do ciclo TCA, assim como também é convertido em ácido láctico e ácidos graxos. A glutamina é em parte transformada em amônio e glutamato, o qual é convertido em outros aminoácidos empregados na biossíntese. A outra porção da glutamina consumida pela célula participa do ciclo TCA, fornecendo carbono para síntese de aminoácidos, gerando

também ATP, CO₂ e H₂O (SHULER; KARGI, 2002). A Figura 3 apresenta as relações entre as vias metabólicas de consumo de glicose e glutamina e o ciclo TCA.

Figura 3. Simplificação das vias metabólicas de consumo de glicose e glutamina e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Legenda: 6-P-G: 6-P-gluconato; Gli-6P: glicose-6-fosfato; R-5P: ribose-5-fosfato; GAP: gliceraldeído; DHAP: dihidroxiacetona; AcCoA: acetil-coenzima A; OAA: oxaloacetato; αCG: α cetoglutarato.



Adaptado de (SHULER; KARGI, 2002).

A concentração de oxigênio dissolvido no meio apresenta grande influencia no metabolismo das CTMs. Em condição de hipóxia (atmosfera contendo 1 - 5% O₂) as CTMs tendem a manter o estado indiferenciado, desde que não ocorra esgotamento de glicose (PARK et al., 2013). Nessa condição, com cerca de 20% de oxigênio dissolvido, as CTMs podem proliferar utilizando a rota de glicólise anaeróbica para metabolismo da glicose. Em condição normóxica (atmosfera contendo 21% O₂), à medida que as CTMs passam a proliferar, elas alternam o metabolismo da glicose para a rota de fosforilação oxidativa, mais eficiente em termos energéticos (BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014). A permanência das CTMs utilizando a rota de fosforilação oxidativa por período prolongado gera aumento de espécies reativas do oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) no interior das células, promovendo a senescência e morte celular (BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014).

2.1.2. A expressão gênica das CTMs em cultivo

As condições aplicadas na expansão das CTMs, como modo de crescimento (2D ou 3D), modo de agitação do biorreator, suporte de ancoramento, procedimento para recuperação das CTMs (procedimento para desaderir as CTMs do suporte de ancoramento), suplementação do meio de cultivo e concentração de oxigênio, influenciam a expressão gênica das CTMs, assim como a liberação de fatores bioativos e vesículas extracelulares no meio condicionado (LIN; DU, 2018; MADL; HEILSHORN; BLAU, 2018).

Cunha e colaboradores (2017) ressaltaram a importância da análise de expressão gênica em estudo sobre impacto do processo de recuperação de CTMs derivadas da medula óssea expandidas em microcarregador Synthemax® II (16 g/L), em biorreator de tanque agitado *single-use* operando com 20% de saturação com ar. Nesse estudo, foi observado que um grupo de 629 proteínas (relacionadas à viabilidade celular, montagem e organização celular, movimentação celular, síntese protéica e modificação pós-transcricional) apresentou regulação negativa e outro grupo contendo 730 proteínas (também relacionadas à viabilidade celular e síntese protéica e ao crescimento e proliferação celular, modificação pós-transcricional e degradação protéica), apresentou regulação positiva, após o processo de recuperação celular proposto no estudo, comparando-se com as CTMs após o processo de expansão no biorreator (CUNHA et al., 2017). Tal estudo evidencia que não apenas o processo de expansão, mas também os processos de coleta das células expandidas (recuperação), lavagem e redução de volume para utilização clínica das CTMs, geram impacto na condição das células.

Em trabalho sobre expansão de CTMs derivadas da medula óssea em frasco de cultura (2D) e como esferóides em frasco spinner (3D), durante 7 dias, foi constatado que diversos genes ligados às funções biológicas, como viabilidade celular e produção de matriz extra-celular, apresentaram expressão positiva nas CTMs cultivadas em 3D com relação ao cultivo em 2D. Neste estudo, foi verificada expressão positiva do gene IL24 nas CTMs cultivadas em 3D, o qual está relacionado à indução de apoptose em células cancerosas (FRITH; THOMSON; GENEVER, 2010). Em ensaio *in vitro* foi verificada queda da viabilidade de diferentes linhagens de células cancerosas cultivadas com meio condicionado derivado da CTM com expressão positiva do gene IL24 (FRITH; THOMSON; GENEVER, 2010). Bartosh e colaboradores (2010), também trabalhando com esferóides de CTMs derivadas da medula óssea, apresentaram que as CTMs em 3D, comparadas com as CTMs

expandidas em 2D, expressaram mais intensamente fatores com ação antitumorigênica, IL24, TNF α e CD82 (BARTOSH et al., 2010).

Ren e colaboradores (2013) estudaram o problema da senescência das CTMs derivadas da medula óssea submetidas a sucessivas passagens *in vitro*, e apresentaram que 2.122 genes sofreram desregulação ao longo de 15 passagens, os quais estão ligados ao crescimento e proliferação celular e resposta imunológica. Nesse estudo, os autores selecionaram 24 genes cuja expressão está intimamente ligada à senescência das CTMs, entre eles os genes WISP1, RUNX2, KLF8, TM7SF4, ADAMTS9, IRAK3 e EYA4 com regulação negativa e os genes TEK, ARHGAP29 e SCN9A com regulação positiva (REN et al., 2013). Marques e colaboradores (2017) identificaram que as funções mais afetadas em CTMs derivadas de cordão umbilical senescentes são proliferação e crescimento celular, morte celular e sinalização e movimentação celular, propondo 11 genes como biomarcadores para senescência e tumorigênese (MARQUES et al., 2017). O gene p21 (expressão associada a dano no material genético e controle do ciclo celular) também foi descrito como importante marcador de senescência para CTMs derivadas da medula óssea e de cordão umbilical (CHENG et al., 2011).

Além de investigar a senescência, a análise da manutenção da “condição de célula-tronco” das CTMs (*stemness*) é igualmente necessária (MARQUES et al., 2017). Pode-se citar a expressão dos genes marcadores de pluripotência NANOG, OCT4 e SOX2 como indicadores do potencial de crescimento e proliferação das CTMs indiferenciadas (PICCINATO et al., 2015). Piccinato e colaboradores (2015) apresentam que a expressão positiva do gene OCT4 e negativa do gene p16^{INK4A} (envolvido no controle do ciclo celular) podem ser empregadas como principais marcadores da qualidade das CTMs para uso clínico (PICCINATO et al., 2015).

A análise de expressão gênica das CTMs após o processo final de expansão e recuperação (no caso de CTMs aderidas em suportes de ancoramento) é de essencial importância para averiguar a condição das CTMs, garantindo equilíbrio entre a expressão de marcadores de senescência e pluripotência e, com isso, a segurança da aplicação em terapia celular (MARTIN et al., 2017; PICCINATO et al., 2015).

2.1.3. Liberação de Fatores Bioativos e Vesículas Extracelulares pelas CTMs em cultivo

A utilização de fatores bioativos e vesículas extracelulares derivadas das CTMs para tratamentos clínicos, em terapias livres de células (*cell-free therapies*), não apresentam problemas associados à terapia celular, como risco de rejeição (em tratamento alogênico) e a necessidade de manipulação mínima, para evitar acumulação de instabilidades cromossômicas no caso do uso de CTMs, em acordo com os Atributos Críticos de Qualidade (*Critical Quality Attributes - CQA*) (MARTIN et al., 2017).

Outra questão problemática verificada por pesquisadores, está no fato de que as CTMs após infusão no paciente apresentam tempo de vida curto (GALLEU et al., 2017). Agrawal H. e colaboradores (2014) apresentaram em modelo animal com CTM derivada de tecido adiposo que, em 3 semanas, 95% das CTMs infundidas não tiveram mais o sinal do marcador fluorescente detectado (AGRAWAL et al., 2014). Muhammad G. e colaboradores (2017), também trabalhando com CTMs derivadas de tecido adiposo, constataram que, apesar do tempo de vida curto após infusão, as CTMs aceleraram o processo de recuperação em lesões na pele geradas por queimaduras, sugerindo a importância da liberação de fatores bioativos e VEs derivados das CTMs (MUHAMMAD et al., 2017).

As CTMs cultivadas em 2D, como nos tradicionais frascos de cultura, sofrem redução do seu potencial terapêutico em função da modificação no citoesqueleto e dinâmica de cultivo, condições pouco semelhantes ao ambiente *in vivo* (BECQUART et al., 2016; CHA et al., 2018; COSTA et al., 2017; LEE et al., 2018). As CTMs cultivadas em estrutura 3D apresentam maior potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos e aumento na produção de fatores tróficos (anti-inflamatório, supressor tumoral, receptor quimiotático e pró-angiogênico) (SART et al., 2014). Em cultivo 3D as CTMs secretam maior nível de microvesículas e exossomos (CHA et al., 2018), assim como maior produção de fibronectina e laminina (LEE et al., 2018). CTMs derivadas de cordão umbilical avaliadas em cultivo dinâmico em biorreator de tanque agitado (impelidor de pás, volume de 500 mL, concentração de microcarregador de 2 g/L e concentração inicial de CTMs de $2,4 \times 10^4$ células/mL), com atmosfera em hipóxia (5% O₂), apresentaram maior liberação de fatores tróficos em comparação ao cultivo em normóxia (21% O₂) (TEIXEIRA et al., 2015). A condição de hipóxia moderada está relacionada com regulação positiva da produção de fatores pró-angiogênicos (VEGF, FGF-2 e HGF) (BHANG et al., 2011).

Todos os tipos celulares liberam no meio em que se encontram vesículas extracelulares envoltas por bicamada lipídica, com diâmetros que variam entre 10.000 - 30 nm. A população de VEs compreende corpos apoptóticos (2.000 - 50 nm), microvesículas (1.000 - 50 nm) e exossomos (100 - 30 nm) (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; WILLMS et al., 2018). Além dos citados, existem os oncosomas, uma população de VEs com diâmetros maiores (10.000 - 1.000 nm), a qual é unicamente liberada por células cancerosas (MINCIACCHI et al., 2015). Os corpos apoptóticos são originados do rompimento de células apoptóticas e formados por material do citoplasma e membrana plasmática. As microvesículas se originam de brotamento da membrana plasmática. Os exossomos são formados no citoplasma da célula, por processo de origem endocítica (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As VEs desempenham importante papel na comunicação intercelular, transportando lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Por operarem o transporte de material biológico, as VEs são candidatas no desenvolvimento de terapias para entrega de fármacos. Além disso, funcionam como um registro da condição das células-mãe (células que deram origem às VEs), operando como biomarcadores (WILLMS et al., 2018).

Hu L. e colaboradores (2016) demonstraram, em estudo *in vitro*, que exossomos derivados de CTM do tecido adiposo foram internalizados no citoplasma de fibroblastos e aumentaram a expressão de genes relacionados com migração e proliferação celular. Em modelo animal, a injeção intravenosa dos exossomos acelerou o processo de cicatrização em ferida cutânea, com 90% do fechamento da ferida em 21 dias, comparado com menos de 75% do grupo controle (HU et al., 2016). Shi e colaboradores (2017) apresentaram que exossomos derivados de CTM gengival inseridos em hidrogel e aplicados em modelo animal também proporcionaram melhora no fechamento de feridas na pele, com aproximadamente 95% de cicatrização em 14 dias, comparado com menos de 80% do grupo controle (SHI et al., 2017).

A maior parte dos estudos envolvendo VEs destaca os exossomos, contudo as microvesículas e corpos apoptóticos possuem igual importância e função biológica (AKERS et al., 2013; PHINNEY et al., 2015; WILLMS et al., 2018). Microvesículas derivadas de CTMs da medula óssea cultivadas em modelo 3D apresentaram diversidade de fatores bioativos e atividade angiogênica e neurogênica comprovadas *in vitro* (CHA et al., 2018). Apesar dos benefícios de ser uma terapia livre de células e do reduzido potencial tumorigênico, a aplicação das VEs derivadas das CTMs em tratamentos clínicos requer cautela e análises aprofundadas sobre a interação das VEs e células tumorais (RANI et al., 2015). Outro ponto problemático é a eliminação das VEs pelo sistema de defesa do paciente, como monócitos e macrófagos,

prejudicando a entrega da informação transportada pelas VEs no local desejado (WATSON et al., 2016). Além disso, por se tratar de uma população de vesículas bem heterogênea, fortemente dependente do tipo celular e condição de cultura *in vitro*, e com carência de protocolos padronizados de purificação, a utilização das VEs em terapias clínicas esbarra na problemática da padronização do processo e produto final (LIN; DU, 2018).

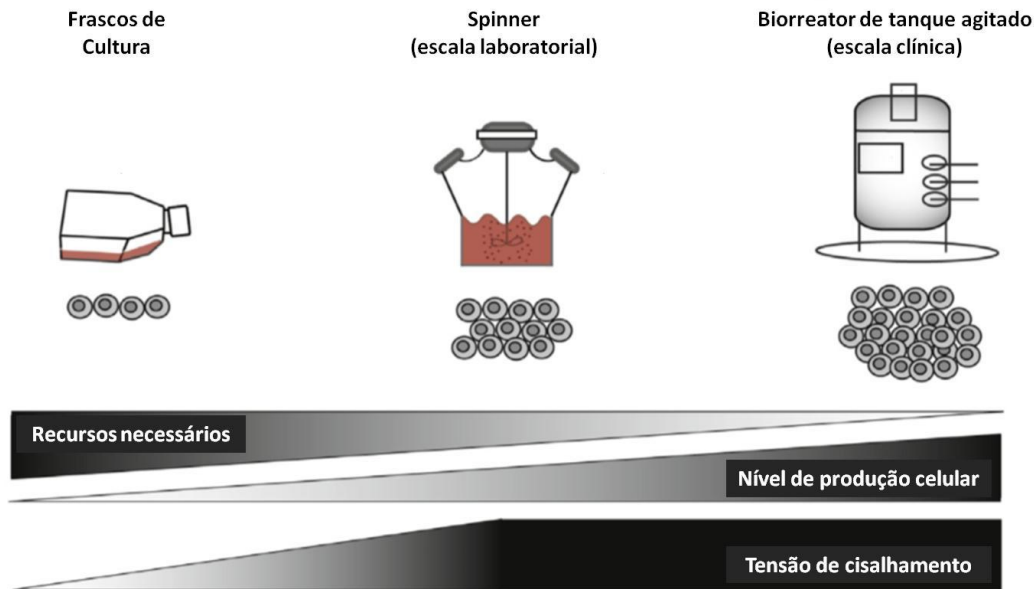
2.2. Expansão de Células-Tronco Mesenquimais

A expansão das CTMs pode ser feita em cultivos bidimensionais (2D) ou tridimensionais (3D). A expansão em 2D engloba o cultivo em frascos - T ou em frascos multi-camadas, onde as células crescem aderidas à superfície plana do frasco. Já a expansão em cultivos 3D em biorreatores, por exemplo, ocorre com a adesão das CTMs em uma superfície de ancoramento, como os microcarregadores, ou no espaço extracapilar, como no biorreator de fibras ocas. Há também o cultivo em 3D de CTMs encapsuladas no interior de microesferas de alginato (SERRA et al., 2011) ou em agregados de células (SART et al., 2014).

Com relação ao cultivo em 3D, é importante haver controle do diâmetro dos agregados produzidos, que os mesmos sejam homogêneos e que se tenha um sistema reprodutível, visando à aplicação terapêutica. O cultivo em 3D em biorreator de tanque agitado é uma alternativa para atingir os requisitos acima citados (SART et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2016). Conforme apresentado na Figura 4, o aumento de escala de produção, no exemplo utilizando frasco spinner e biorreator de tanque agitado, possibilita maior produtividade celular e redução dos custos de produção (JANASZAK; WOLFE; T. AHSAN, 2016). Além disso, reduz o número de operações manuais e o risco de contaminação (CIERPKA et al., 2013), ao passo que conduz à problemática da exposição das CTMs às tensões de cisalhamento (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1988).

A exposição das CTMs às tensões de cisalhamento influencia tanto a viabilidade celular como a liberação de fatores tróficos (BECQUART et al., 2016) e pode estimular a diferenciação em osteócitos (DATTA et al., 2006). São reportados níveis toleráveis de tensão de cisalhamento para cultivo de CTMs durante a fase de expansão entre 0,3-0,4 Pa em frasco spinner e 0,08-0,15 Pa em biorreator de tanque agitado (DE SOURE et al., 2016).

Figura 4. Plataformas para expansão de CTMs, apresentando a variação de escala de produção e do nível de tensão de cisalhamento, partindo de frascos de cultura para sistemas dinâmicos homogêneos.

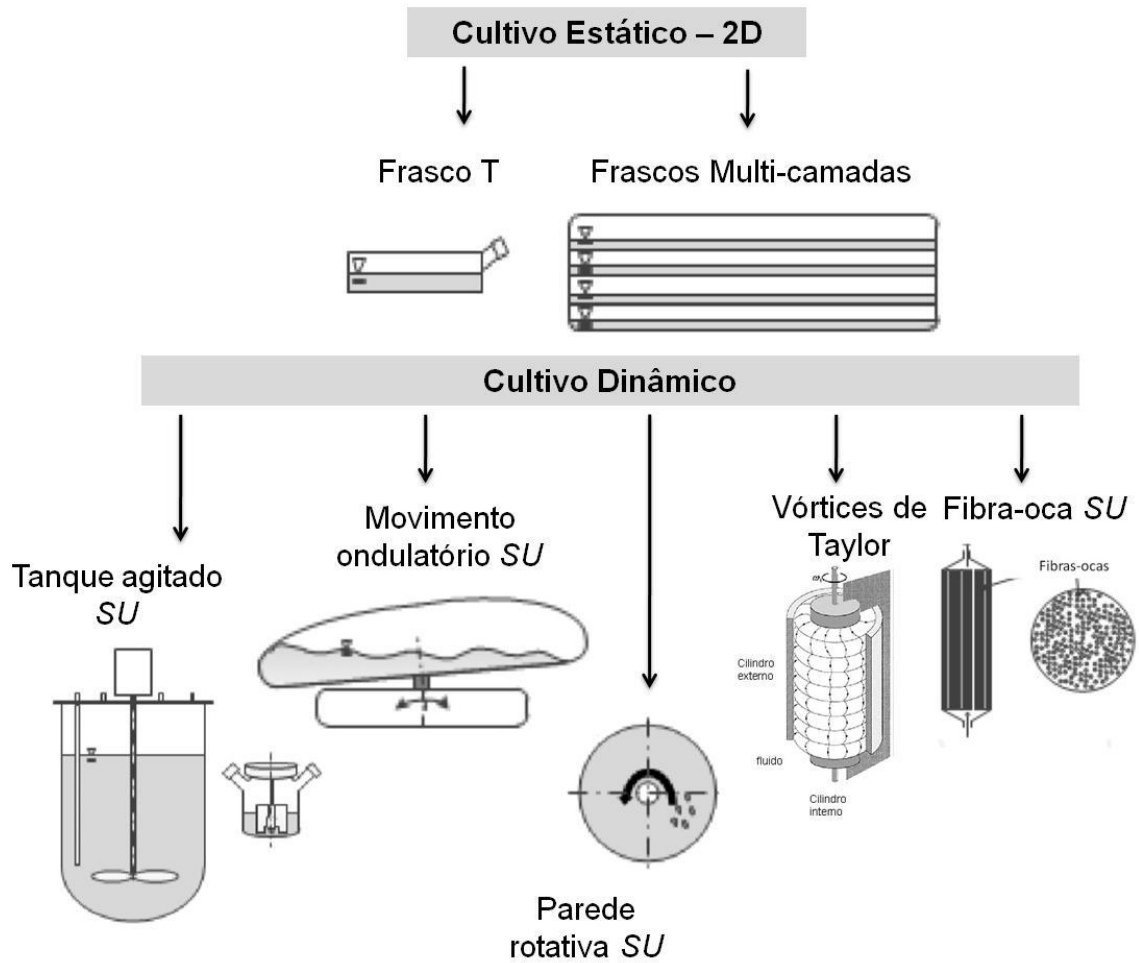


Adaptado de (JANASZAK; WOLFE; T. AHSAN, 2016).

Atualmente, em função das inovações tecnológicas, especialmente no que se refere à forma de assepsia, os biorreatores podem ser classificados em *Biorreatores tradicionais* e *Biorreatores Single-use*.

Diversos tipos de biorreatores têm sido estudados para expansão de CTMs. Os biorreatores tradicionais consistem naqueles fabricados por material inerte como vidro e aço inoxidável (316, 316L - (AL-RUBEAI, 2015)), em que a esterilização do mesmo ocorre *in situ*. Biorreatores englobados no termo *Single-use* se caracterizam por não necessitarem de esterilização *in situ*. São adquiridos previamente esterilizados e validados pela empresa fornecedora. O compartimento de cultivo é feito de material aprovado pela FDA (polietileno, etileno vinil acetato, policarbonato e poliestireno) (MASY, 2011). A grande maioria dos biorreatores tradicionais é encontrada com essa tecnologia, como: spinner, biorreator de paredes rotativas, biorreator de tanque agitado e os biorreatores com movimento ondulatório (designados como *rocking motion bioreactor* ou *wave-induced motion bioreactor*). A Figura 5 apresenta modelos de cultivo de acordo com a forma de crescimento (2D ou 3D) e os biorreatores aplicáveis na expansão de CTMs.

Figura 5. Modelos para cultivo de Células-Tronco Mesenquimais. Classificação quanto ao modo de crescimento e tipo de agitação.



Adaptado de (JOSSEN et al., 2014). Desenho esquemático do biorreator de Vórtices de Taylor adaptado de (KYUN CHOI et al., 1999). Os biorreatores disponíveis do tipo *Single-Use* estão identificados com a abreviação *SU*. Dimensões sem correspondência com a dimensão original.

Biorreator Spinner: Esse modelo de biorreator pode ser empregado no cultivo de células com crescimento em suspensão e células aderentes. No frasco spinner tradicional não é possível realizar o controle de pH, oxigênio dissolvido, injeção de gases e temperatura. Deve ser mantido em incubadora para manter atmosfera e temperatura controladas, e a agitação é feita por indução magnética. Os modelos tradicionais são produzidos com vidro, com volumes de trabalho de 100 a 5.000 mL (AL-RUBEAI, 2015). Grande parte dos estudos para expansão de CTMs é realizada em frasco spinner. Nesse biorreator obtiveram-se fatores de expansão, para CTMs provenientes da medula óssea, de $8,4 \pm 0,8$ vezes com microcarregador CultiSpher-S® (EIBES et al., 2010) e 9,6 vezes com microcarregador MAG (WODEWOTZKY, 2015).

Biorreator de Tanque Agitado: O biorreator de tanque agitado, empregado para células em suspensão e aderentes, consiste de um vaso cilíndrico com impelidor acionado por motor externo. O controle de gases e aquecimento é feito por um sistema de controle próprio. Apresenta *design* simples, com sistema de operação e amostragem acessíveis (RODRIGUES et al., 2011). Esse biorreator pode ser operado em diferentes regimes de alimentação de meio de cultivo (batelada, batelada alimentada e perfusão). O volume destinado ao meio de cultivo corresponde entre 70 a 80% do volume do biorreator (EIBL et al., 2009). Quanto maior a escala de trabalho, os processos de agitação e aeração tornam-se mais complicados, assim como a garantia de assepsia do cultivo.

Os biorreatores de tanque agitado para cultivo de células animais possuem alterações que visam reduzir o estresse mecânico imposto às células. O diâmetro dos turbilhões gerados pelo sistema de agitação deve ser maior que o diâmetro celular para evitar danos à membrana plasmática (CROUGHAN; HAMEL; WANG, 1987). As células com maiores riscos a danos são as que ficam localizadas próximas às paredes do biorreator e na interface líquido-gás, nesse caso, devido ao rompimento de bolhas de ar. A exposição contínua das células a um ambiente com estresse mecânico moderado, que não cause morte imediata por necrose, pode provocar modificações na fisiologia que induzam morte por apoptose (SHULER; KARGI, 2002).

Com CTM proveniente de cordão umbilical, Mizukami e colaboradores (2016) obtiveram um fator de expansão de $7,5 \pm 1,2$ vezes em biorreator de tanque agitado empregando microcarregador CultiSpher-S[®] e meio sem adição de SFB (MIZUKAMI et al., 2016). Em biorreator de tanque agitado *Single-use* aplicado na expansão de CTM proveniente de tecido adiposo, Schirmaier e colaboradores (2014) obtiveram fator de expansão de $35,4 \pm 0,5$ vezes utilizando o microcarregador ProNectin[®]-F (SCHIRMAIER et al., 2014).

Biorreator de Paredes Rotativas: Nesse biorreator, formado por dois cilindros concêntricos horizontais, as células crescem em suspensão ou aderidas em superfícies de ancoramento no meio de cultivo contido entre os dois cilindros. A parede gira lentamente por indução magnética e a mistura ocorre pelo movimento giratório somado à circulação externa do meio (JOSSEN et al., 2014). Pelo movimento giratório do cilindro externo a força gravitacional é equilibrada com a força centrífuga, cria-se assim um ambiente de microgravidade no espaço anular. Esse biorreator foi desenvolvido inicialmente pela NASA para estudos de comportamento celular e crescimento de tecido em ambiente com baixa gravidade. Nesse modelo de biorreator

foi registrado fator de expansão de $38,7 \pm 6,1$ vezes com CTM derivada de cordão umbilical (REICHARDT et al., 2013).

Biorreator de Vórtice de Taylor: O biorreator de Vórtice de Taylor também usa o princípio de um biorreator de parede rotativa, porém, em posição vertical. Nesse biorreator, o cilindro externo é fixo enquanto que o interno gira, gerando padrões de escoamento em vórtices toroidais de Taylor no volume de trabalho contendo as células (SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011). Trata-se de um biorreator com potencial para aplicação no cultivo de CTMs, já que não possui impelidor, evitando assim tensões de cisalhamento pontuais altas. Com CTM imortalizada derivada da medula óssea, foi registrado para esse biorreator um fator de expansão celular de 9,0 vezes utilizando microcarregador CultiSpher-S[®] (GIL, 2015).

Biorreator de Fibra Oca: O biorreator de fibra oca é formado por um cartucho de fibras poliméricas. A aplicação da técnica de crescimento de células no exterior de microfibras de plástico foi desenvolvida por (KNAZEK et al., 1972). As fibras apresentam porosidade tal que permite, devido aos gradientes de concentração, o fornecimento de nutrientes e oxigenação às células, assim como a retirada de metabólitos tóxicos, possibilitando o crescimento das células entre as fibras (VÉLIZ; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008). O monitoramento e controle desse modelo de biorreator não são simples (RODRIGUES et al., 2011). O *design* do biorreator de fibra oca pode gerar uma alta limitação da transferência de massa dos nutrientes e metabólitos, quando o processo atinge elevada densidade celular, o que resulta na queda da viabilidade do cultivo (EIBL et al., 2009). Nesse modelo de biorreator, tem-se registrado fatores de expansão celular de $9,8 \pm 1,0$ vezes com CTM derivada de cordão umbilical (MIZUKAMI et al., 2018) e entre 6,7-13,8 vezes com CTM derivada da medula óssea (LECHANTEUR, 2014).

Biorreator com Movimento Ondulatório (*Rocking Motion* ou *Wave-induced Motion Bioreactor*): A tecnologia *Single-use* começou a conquistar espaço entre os biorreatores tradicionais com este modelo de biorreator. O compartimento empregado para o cultivo, denominado de Cellbag, é fabricado com material plástico biocompatível e inerte (Polietileno de baixa densidade/Etileno Vinil Acetato), aprovado pela FDA, e previamente esterilizado por radiação gama (SINGH, 1999). Por ser de uso único e pré-validado, elimina a necessidade de validação do processo de esterilização do biorreator, reduzindo custos e tempo para iniciar o processo de produção. Existem Cellbags de diferentes capacidades, facilitando o *scale-up* do processo. Dado uma capacidade de trabalho da Cellbag, a capacidade máxima para o meio de cultivo corresponde a 50% desse volume. O Biorreator Wave[™] da GE

Healthcare possui sensores para monitoramento de pH, temperatura e oxigênio dissolvido na Cellbag.

A intensidade do movimento de ondas induzido pelo balanço da plataforma, sobre a qual é colocada a Cellbag, é facilmente controlada através da escolha da frequência e o ângulo do balanço. A temperatura do cultivo é mantida constante através do aquecimento da superfície metálica da plataforma que fica em contato com a Cellbag. Também é possível o controle da composição da atmosfera em contato com o meio de cultivo através da regulação da velocidade de injeção de CO₂, N₂, O₂ e ar. A esterilidade da linha de gás que entra na Cellbag é garantida através de um filtro com 0,2 µm (SINGH, 1999).

É possível operar o biorreator com movimento ondulatório em diferentes regimes de alimentação, como batelada, batelada alimentada e perfusão. Para o regime de perfusão, a plataforma do biorreator com movimento ondulatório pode ser acoplada a um módulo de perfusão, para controle da injeção e saída de fluido (EIBL; EIBL, 2009). Para operar em regime de perfusão deve-se utilizar modelo de Cellbag que possui um filtro acoplado para retenção das células. O filtro flutua no meio e move-se juntamente com a Cellbag. O sistema de filtração interno à Cellbag mostrou-se eficiente para volumes de trabalho de até 100 L (EIBL; EIBL, 2009).

Através do movimento de ondas imposto ao meio de cultivo contendo células, com uma área de interface líquido-ar incrementada pela formação das ondas, ocorre a transferência de oxigênio para o meio líquido. Para Cellbag de 2 L operando com 100 mL, os valores de $k_L a$ são da ordem de 1,6 h⁻¹ e para Cellbag de 20 L operando com 10 L, os valores de $k_L a$ são da ordem de 4,0 h⁻¹ (SINGH, 1999). O movimento de ondas induzido pela plataforma não é agressivo às células, já que não há formação de bolhas ou choques com impelidor, e facilita a alternância entre as camadas de fluido, o que eleva o potencial de mistura (VÉLIZ; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008). O tempo de mistura para que o fluido atinja homogeneidade varia entre 5 e 10 segundos em Cellbag de 20 L operando com 10 L e 60 segundos em Cellbag de 200 L operando com 100 L (SINGH, 1999).

Nesse modelo de biorreator, Timmins e colaboradores (2012) obtiveram fator de expansão de 16,0 ± 0,4 vezes com CTM proveniente do tecido da placenta e microcarregador CultiSpher-S® (TIMMINS et al., 2012) e Jossen e colaboradores (2016) apresentaram fator de expansão de 6,6 ± 0,6 vezes com CTM proveniente de tecido adiposo, utilizando microcarregador de poliestireno fornecido pela empresa Pall (Pall Corporation, EUA) (JOSSEN et al., 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para ter um ideia mais global do uso de biorreatores para cultivo de CTMs, foi realizado um levantamento bibliográfico, cujo resultado está organizado na Tabela 1, onde se apresentam fatores de expansão de CTMs para diferentes modelos de biorreatores e microcarregadores.

Tabela 1. Relação de biorreatores empregados no cultivo de Células-Tronco Mesenquimais e Fatores de expansão celular obtidos.

Biorreator	Estrutura para expansão	Célula	Volume (mL)	Tempo (dias)	FE	Referência
Fibra Oca (SU)	FO: 11.500 área: 2.1 m ²	CTM-medula óssea	-	7	6,7-13,8	(LECHANTEUR, 2014)
Movimento ondulatório (SU)	MC - CultiSpher-S	CTM-placenta	500	7	16,0±0,4	(TIMMINS et al., 2012)
Movimento ondulatório (SU)	MC - poliestireno	CTM-tecido adiposo	1.500	9	6,6±0,6	(JOSSEN et al., 2016)
Movimento ondulatório (SU)	MC - Cytodex3	wt-hMSCs e hMSCs-TERT	300	18	6,0	(ÅKERSTRÖM, 2009)
Spinner	MC - CultiSpher-S	CTM-medula óssea	50	8	8,4±0,8	(EIBES et al., 2010)
Spinner	MC - CultispherG	CTM-medula óssea	50	6	6,9	(SUN et al., 2010)
Spinner	MC - MAG	CTM-medula óssea (hMSC-TERT)	50	9	9,6	(WODEWOTZKY, 2015)
Spinner	MC - Cytodex3	CTM-placenta	100	9	20,0	(HEWITT et al., 2011)
Spinner (SU)	MC - ProNectin®-F	CTM-tecido adiposo	100	6	31,4±3,6	(KAISER et al., 2013)
Tanque agitado	MC - CultiSpher-S	CTM-cordão umbilical	800	6	7,5±1,2	(MIZUKAMI et al., 2016)
Tanque agitado - BIOSTAT® Cultibag (SU)	MC - ProNectin®-F	CTM-tecido adiposo	2.000	7	35,4±0,4	(SCHIRMAIER et al., 2014)
Tanque agitado - Mobius® (SU)	MC - Collagen-Coated-Pall	CTM-medula óssea	50.000	11	43,0	(LAWSON et al., 2017)
Tanque agitado - UniVessel® (SU)	MC - Synthemax® II	CTM-medula óssea	2.000	7	13,6±0,5	(CUNHA et al., 2017)
Tanque agitado - UniVessel® (SU)	MC - Synthemax® II	CTM-tecido adiposo	2.000	7	16,4	(CUNHA et al., 2017)
Vórtice de Taylor	MC - CultiSpher-S	CTM-medula óssea (hMSC-TERT)	60	10	9,0	(GIL, 2015)

FO: número de fibras ocas. SU: Single-Use.

2.2.1. Cultivo de CTMs em 3D

Superfícies para ancoramento - Microcarregadores (MCs)

O cultivo de células aderentes em microcarregadores (MCs) foi iniciado por volta de 1960 (FRESHNEY, 2010). A elevada relação entre a área superficial e volume do cultivo empregando microcarregadores, geralmente em forma esférica, permite obter maiores densidades celulares com menor uso de material (LUBINIECKI, 1990). O material com que o microcarregador é fabricado tem por objetivo propiciar melhor adesão e proliferação das células, além de facilitar a etapa de recuperação celular ao término do cultivo. Dentre os materiais empregados estão a celulose, dextrana, colágeno, gelatina, vidro e poliestireno. De acordo com a porosidade do material base, os microcarregadores são classificados em microporosos (diâmetro de poro inferior a 30 μm) ou macroporosos (diâmetro de poro superior a 30 μm), com diâmetro ideal para os microcarregadores entre 300 e 500 μm , a fim de evitar limitações por transferência de massa (PÖRTNER, 2015; VÉLIZ; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008).

É desejável que a densidade do microcarregador seja pouco maior que a densidade do meio de cultivo, para que não seja necessário empregar altas velocidades de agitação a fim de manter os microcarregadores em suspensão, o que pode causar a desadesão das células (LUBINIECKI, 1990). O choque entre microcarregadores pode resultar em danos às células aderidas na superfície externa. Assim, o emprego de microcarregadores macroporosos torna-se mais eficiente, porém há maior dificuldade em garantir ambiente homogêneo no interior dos poros (SHULER; KARGI, 2002). O crescimento no interior dos poros permite a proliferação das células em forma tridimensional, possibilitando melhor sinalização celular e atividade biológica das CTMs (MADL; HEILSHORN; BLAU, 2018; VÉLIZ; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008). A Tabela 2 apresenta modelos de microcarregadores disponíveis no mercado. Dentre os modelos citados, destacam-se para cultivo com CTMs os microcarregadores Cultispher-G, CultiSpher-S, Cytodex 3, Cytodex 1, ProNectin e Synthemax II.

A concentração usual de microcarregadores para cultivo de CTMs varia entre 1 - 4 g/L (PANCHALINGAM et al., 2015). A relação do número de células por microcarregador obtida no começo do cultivo é determinante para o bom desempenho do mesmo. Hewitt e colaboradores (2011) estabeleceram a relação de 5 células/MC como ideal, obtendo fator de expansão celular de 20 vezes com microcarregador Cytodex 3, para expansão de CTM proveniente de placenta (HEWITT et al., 2011). Yuan e colaboradores (2012) também definiram como 5 células/MC a melhor relação

inicial de células por microcarregador (YUAN et al., 2012). Os elevados fatores de expansão verificados em condição de baixa razão do número de células por microcarregador estão relacionados à maior disponibilidade de área para crescimento e de nutrientes (NEUHUBER et al., 2008).

Agregados de células

As CTMs também estão sendo estudadas em cultivos na forma de suspensão de agregados de células. Nesse modo de crescimento, como não é utilizada uma superfície de ancoramento, a coleta das células ao término das culturas é facilitada, o que simplifica o bioprocessamento de expansão das CTMs e reduz a perda de células (RODRIGUES; NOGUEIRA; CABRAL, 2018).

Alimperti e colaboradores (2014) expandiram CTMs provenientes de medula óssea em esferóides em erlenmeyer com 125 mL de meio de cultivo, sob agitação orbital de 80 rpm, e obtiveram células recuperadas dos agregados com diâmetro médio significativamente menor quando comparado às células cultivadas em 2D (ALIMPERTI et al., 2014). Bartosh e colaboradores (2010) verificaram melhora do potencial de ação antiinflamatória e melhor potencial de distribuição uniforme em tecidos de CTMs obtidas da medula óssea em culturas em agregados celulares, pelo método *hanging drop*, contendo cada gota entre 10.000-250.000 células (BARTOSH et al., 2010). Tsai e colaboradores (2017) apresentaram estudo aplicando plataforma com movimento ondulatório para avaliar a cinética de agregação de CTMs. Os experimentos foram conduzidos em placas de poços colocadas sobre a plataforma, avaliando as condições de cisalhamento empregadas às CTMs. Os autores apresentaram que o movimento ondulatório pode ser uma alternativa para produção de agregados celulares, além de possibilitar a regulação do diâmetro dos agregados celulares formados (TSAI et al., 2017).

O encapsulamento das CTMs em uma matriz polimérica, usualmente alginato de cálcio, é um método alternativo para crescimento em 3D. O processo de encapsulamento consiste na adição de gotas da suspensão de células em solução de alginato de cálcio a uma solução de cloreto de cálcio (SERRA et al., 2011). As esferas formadas podem ser recobertas por polilisina a fim de elevar a estabilidade mecânica e química. A recuperação das células é feita por tratamento com quelante de cálcio (HU, 2013). O cultivo 3D de CTMs encapsuladas em microesferas de alginato permite controle do diâmetro de agregados celulares, manutenção do potencial pró-angiogênico, antiinflamatório e quimiotático e maior resistência ao estresse oxidativo, quando comparado ao cultivo de CTMs em agregados não encapsulados (COSTA et al., 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2. Modelos de microcarregadores para cultivo de células dependentes de ancoramento.

Modelo	Fabricante	Material	Densidade (g/cm ³)	Área superficial (cm ² /g)	Diâmetro (µm)	Diâmetro de poro (µm)	Carga (+/-)	Número de partículas por grama (MC/g)
Microcarregadores revestidos por proteína animal								
Cultispher-G	PerCELL Biolytica	Tipo I - gelatina porcina	1,04	7500	130-380	10-30	s/ carga	8,0E5
CultiSpher-S	—	Alginato e gelatina	1,02	—	250-355	54	s/ carga	6,0E5
MAG *	—	Dextrana (superfície: Tipo I - gelatina porcina)	1,04	2700	141-211	não poroso	s/ carga	3,0E6
Cytodex 3	GE Healthcare	Tipo I - gelatina porcina)	1,04	2700	141-211	não poroso	s/ carga	3,0E6
Microcarregador revestido por proteína recombinante								
ProNectin	SoloHill Eng. Inc	Poliestireno (superfície: fibronectina recombinante)	1,02	360	125-212	não poroso	+	3,9E5
Microcarregadores Xeno-free								
Cytodex 1	GE Healthcare	Dextrana (superfície: DEAE)	1,03	4400	147-248	não poroso	+	4,3E6
Cytopore 1	GE Healthcare	Celulose (superfície: DEAE)	1,03	11000	200-280	microporoso	+	3,0E6
Cytopore 2	GE Healthcare	Celulose (superfície: DEAE)	1,03	11000	200-280	30	+	3,0E6
Synthemax® II	Corning	Poliestireno (superfície: Synthemax® II coating)	1,02	360	125-212	não poroso	s/ carga	—

DEAE = N,N-dietilaminoetil

Adaptado de (ALFRED et al., 2011; BADENES et al., 2016; RAFIQ et al., 2016). *Dados obtidos de (WODEWOTZKY, 2015).

2.3. Biorreator com Movimento Ondulatório

Para que um protocolo de cultivo de célula seja posto em operação em centros de estudo e pesquisa, o mesmo precisa ser eficiente, seguro e reprodutível. A utilização de biorreatores descartáveis pré-esterilizados com radiação gama, mais conhecidos como Sistemas de Uso Único - SUS (Single-use Systems em inglês), tornou-se uma opção de processo bastante atrativa devido à sua praticidade e economia. Os processos que utilizam biorreatores SUS não necessitam dos certificados de limpeza e esterilização *in situ* (*Cleaning In Place* - CIP e *Sterilization In Place* - SIP), já que os mesmos são fornecidos pelo fabricante da Cellbag. Como não utilizam os processos tradicionais de esterilização do biorreator com vapor, esses sistemas reduzem o tempo de processamento e facilitam a aprovação de protocolos de cultivo pelas agências reguladoras, devido à pré-certificação das Cellbags. Para a indústria de bioprocessos, os dispositivos descartáveis trazem benefícios como flexibilidade da linha de produção, segurança e redução do tempo de preparo dos equipamentos para a operação seguinte (EIBL et al., 2009). O aparato industrial empregando tecnologia SUS apresenta demanda menor por caldeiras e linhas de tubulação de vapor e água. Os biorreatores SUS possibilitam economia de 50% no consumo de energia e redução do consumo de água de 8 a 10 vezes quando comparado aos biorreatores tradicionais. (RAWLINGS; PORA, 2009)

O Biorreator Wave™ foi introduzido no fim da década de 90, tornando-se uma alternativa na tecnologia de biorreatores para o cultivo de células de plantas e animais, viável tanto para células com crescimento em suspensão como para células dependentes de ancoramento (SINGH, 1999). Devido à limitação de aumento de escala, o volume máximo de operação é inferior ao do biorreator de tanque agitado, chegando a um máximo de 4.000 L. Em bioprocessos com CTMs, esse fato não trata-se de um problema, já que os cultivos são realizados em volumes menores, atualmente em torno de 50 L (JOSSEN et al., 2018). Existem basicamente dois tipos de biorreatores de movimento ondulatório: biorreator com plataforma de balanço vertical unidirecional e o mais complexo, com balanço vertical bidirecional (alternando em duas direções perpendiculares) (EIBL; EIBL; PETRA KOHLER, 2012).

Com relação ao cultivo de CTMs em Cellbag em biorreator com movimento ondulatório, Akerström (2009) estudou a proliferação de wt-hMSC (CTM-primária) e hMSC-GFP (CTM-linhagem) com processo de adição de microcarregadores (Cytodex3®). Obteve fator de 6 vezes com 18 dias de cultivo, realizando a fase de adesão em frascos T (ÅKERSTRÖM, 2009). Timmins e colaboradores (2012) não obtiveram crescimento no cultivo de células hpMSC (CTM proveniente de tecido da

placenta) para atmosfera com 5% CO₂ e ar. Tal desempenho não foi alterado com relação à fase de adesão, não obtendo expansão celular independente se a fase de adesão foi realizada dentro ou fora da Cellbag. Contudo, verificaram que o cultivo tornou-se efetivo em atmosfera mantida com 5% O₂ e 5% CO₂, obtendo fator de expansão de 16,0±0,4 em 7 dias de operação (TIMMINS et al., 2012). Jossen e colaboradores (2016) estudando dados de N_{js} (velocidade mínima para suspensão de partículas) em cultivo de CTMs de tecido adiposo em biorreator com movimento ondulatório e microcarregador de poliestireno, obtiveram fator de expansão de 6,6±0,6 em 9 dias de operação, com a fase de adesão celular realizada em frasco shaker (JOSSEN et al., 2016).

Os trabalhos de Akerström (2009) e Timmins e colaboradores (2012) não abordaram detalhadamente a velocidade de agitação empregada e não mencionaram o problema de depósito de microcarregadores no plástico da Cellbag. Além disso, Timmins e colaboradores (2012) deixaram lacunas no que se refere à etapa de adesão realizada no reator, como volume de operação durante a fase de adesão. Jossen e colaboradores (2016) mencionaram a existência da formação de depósito “tipo duna” de microcarregadores apenas para condição de agitação significativamente abaixo do critério de N_{S1u}, reportando que a formação desse depósito reduz à medida que a agitação é elevada. Entretanto, em experimentos conduzidos no LATECC foi verificado que, mesmo em condição de agitação condizente ao valor de N_{S1u} obtido aplicando a correlação apresentada por Jossen et al. (2016), ocorre a formação de depósitos tipo duna devido à deposição gradual das partículas nas superfícies inferiores das extremidades da Cellbag, as quais não retornam ao líquido ainda que na condição de N_{S1u}. Além desse depósito, o depósito de microcarregadores no plástico ao longo da superfície lateral da Cellbag (região de borda líquido-gás) é intensificado com o aumento da agitação da plataforma, fato não mencionado por Jossen et al. (2016).

Agitação Mínima para Suspensão de Partículas

O critério de agitação mínima para suspensão de partículas (N_{S1}) representa a velocidade mínima empregada para que todos os microcarregadores não permaneçam mais de 1 segundo em contato com o fundo do biorreator. O critério de N_{S1u} representa o limite mínimo de N_{S1} para que os microcarregadores localizados no fundo do biorreator estejam em movimento (SCHIRMAIER et al., 2014). Jossen e colaboradores (2016) apresentaram correlação para estimar o critério de N_{S1u} na Cellbag, em função do ângulo de inclinação da plataforma, Φ (°), volume de operação, V (L), massa de microcarregador, m_{MC} (g), área específica de crescimento, A_{MC} (cm².100 mL⁻¹), e densidade do microcarregador, ρ_{MC} (kg.m⁻³) (JOSSEN et al., 2016). Analisando a

correlação apresentada na Equação 1, percebe-se que o critério de $N_{S_{1u}}$ apresenta grande dependência do ângulo de inclinação da plataforma e volume de líquido empregado.

$$N_{S_{1u}} = -2,079 \times \phi + 7,526 \times V - 0,119 \times m_{MC} + 0,00537 \times A_{MC} + 0,0329 \times \rho_{MC} - 6,039$$

(R = 0,977) Equação 1

Regime de Agitação e Potência Dissipada

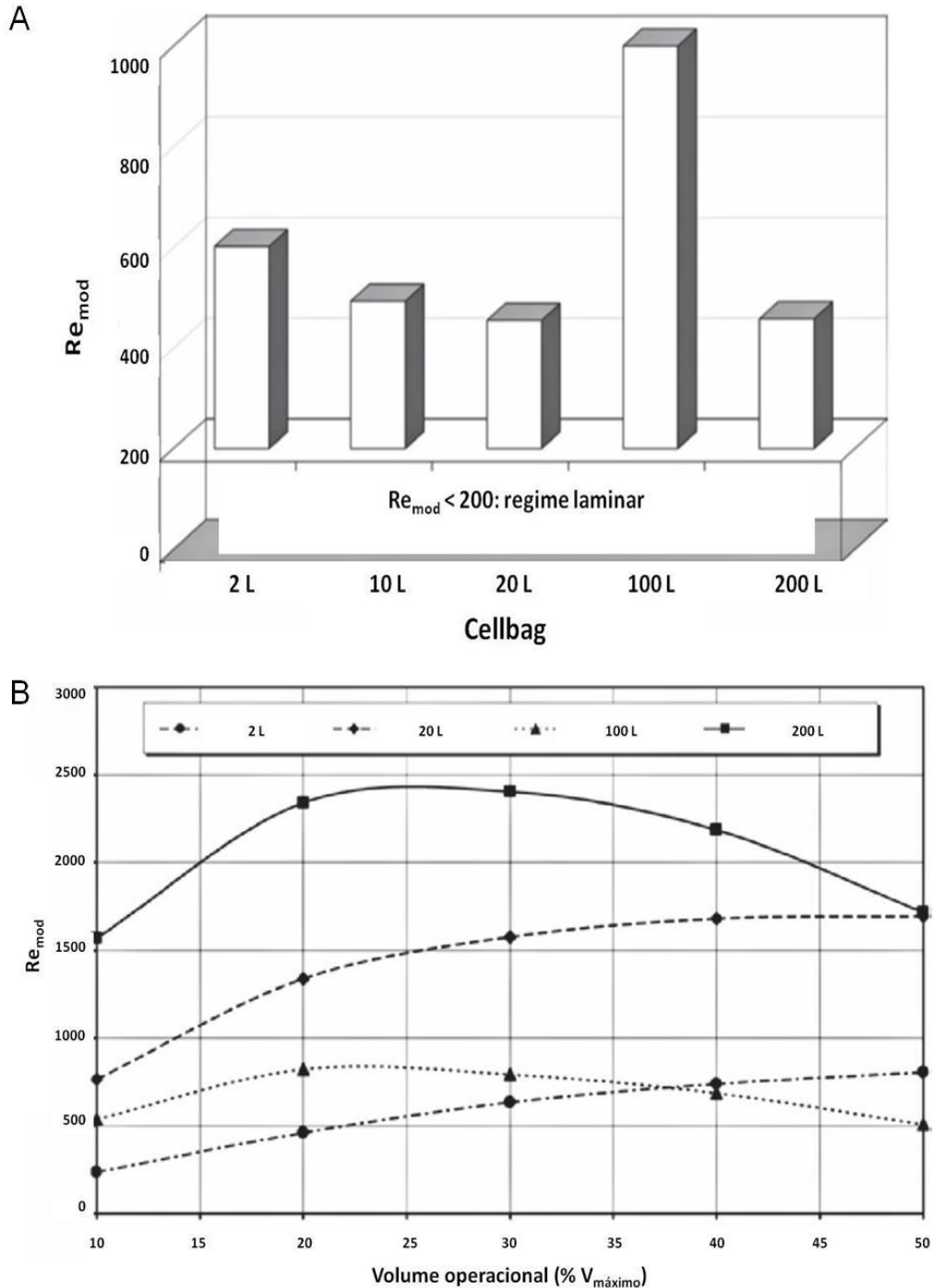
Em trabalho avaliando o regime de fluxo no Biorreator WaveTM, Öncul e colaboradores (2010) descobriram que as tensões de cisalhamento encontradas são mais brandas comparadas com o biorreator de tanque agitado (ÖNCUL et al., 2010). Para descrever a fluidodinâmica do Biorreator WaveTM deve ser utilizado o número de Reynolds modificado (Re_{mod}), o qual leva em consideração as características da Cellbag, como altura da coluna de líquido e um fator de correção para descrever a influência do volume de operação e agitação da plataforma (Equação 2) (EIBL; EIBL, 2009). De acordo com a Equação 2 e análise visual, os autores obtiveram para Cellbag de 2L, regime laminar para valores de Re_{mod} menor que 200 e regime de transição para Re_{mod} entre 200 e 600.

$$Re_{mod} = \frac{V \cdot k \cdot 4 \cdot C}{\nu \cdot (2 \cdot h + B)} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: V: volume de operação (m^3); k: agitação da plataforma (rpm); C: fator de correção dependendo do modelo de Cellbag, agitação e ângulo de inclinação da plataforma e volume de operação; ν : viscosidade cinemática ($m^2 \cdot s^{-1}$); h: altura de líquido na Cellbag (m); B: largura da Cellbag (m).

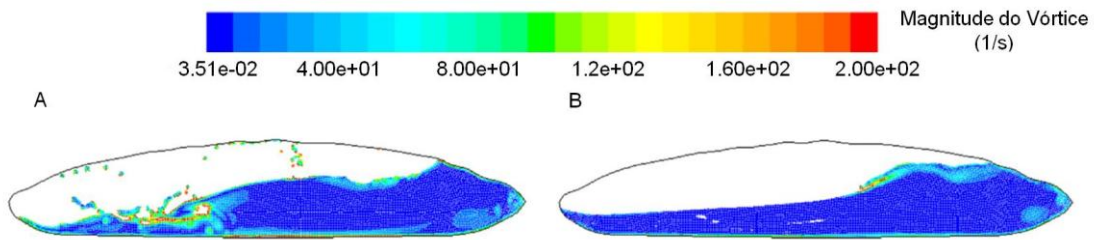
Eibl e Eibl (2009) obtiveram para Cellbag de 2 L, com agitação de 18 rpm e ângulo de 8°, valores de Re_{mod} de aproximadamente 250 para 10% do volume de operação, 650 para 30% do volume de operação e 800 para 50% do volume de operação, como se mostra na Figura 6. Zhan C. e colaboradores (2019) apresentaram, em estudo sobre hidrodinâmica, que o biorreator com movimento ondulatório pode apresentar o fenômeno de ressonância. Em Cellbag operando com 5 L e inclinação de 7°, verificaram na região de interface líquido-gás e ao longo das laterais, a formação de vórtices mais intensos para agitação de 15 rpm, quando comparado com 30 rpm, conforme apresentado na Figura 7. Os autores relacionaram esse resultado ao fenômeno de ressonância, em que a agitação de 15 rpm estaria mais próxima à frequência natural do fluido na condição estudada. Apesar do fluido estar em regime laminar, nas condições do estudo em questão, trajetórias caóticas podem ocorrer, em que o fluido é intensamente distendido e comprimido, o que justificaria a formação dos vórtices mais intensos para a agitação de 15 rpm (ZHAN et al., 2019).

Figura 6. A: Zonas de transição do regime laminar ($Re_{mod} < 200$) para o regime turbulento (Re_{mod} superior ao valor apresentado pelas barras verticais) para Cellbags com diferentes capacidades. B: Valores de Re_{mod} em relação ao volume operacional para Cellbags com diferentes capacidades operando com agitação de 18 rpm e ângulo de inclinação de 8° ($V_{m\acute{a}ximo}$: volume operacional máximo).



Adaptado de (EIBL; EIBL, 2009).

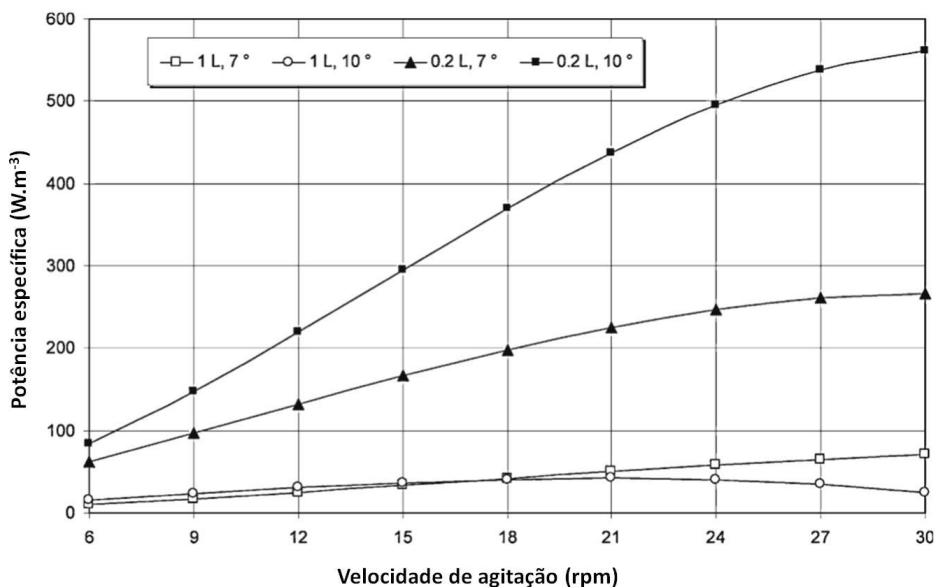
Figura 7. Magnitude dos vórtices formados na fase líquida para Cellbag com 5 L e inclinação de 7°: (A) 15 rpm e (B) 30 rpm.



Adaptado de (ZHAN et al., 2019).

A potência específica (P/V) introduzida no fluido é obtida através do trabalho necessário para realizar o movimento da plataforma, dado o ângulo de agitação e determinando o ponto de gravidade da Cellbag e a área superficial do fluido (EIBL; EIBL, 2009). Eibl e Eibl (2009) descreveram valores de potência específica, para Cellbag de 2 L, entre aproximadamente 100 e 150 W/m^3 , operando entre os ângulos de 7° e 10°, com 0,2 L e agitação de 9 rpm. Os autores apresentaram valores de potência específica menores que 100 W/m^3 , operando nas condições citadas anteriormente, e agitação de 6 rpm (EIBL; EIBL, 2009), como se pode verificar na Figura 8. Para células CHO e hibridoma cultivadas em suspensão celular, valores de potência específica entre 1-5 $\times 10^4$ kW/m^3 podem provocar morte celular (MA; KOELLING; CHALMERS, 2002). No cultivo de células CHO ancoradas em microcarregador, esse valor é na ordem de 1 kW/m^3 (GREGORIADES et al., 2000).

Figura 8. Potência específica dissipada (P/V) de acordo com a agitação da plataforma (entre 6 e 30 rpm) para Cellbag de 2 L, operando com 1 e 0,2 L, com ângulo de inclinação da plataforma de 7° e 10°.



Adaptado de (EIBL; EIBL, 2009).

2.4. Considerações Finais

Com base no exposto, o desenvolvimento de processos de cultivo de CTMs em biorreator com movimento ondulatório possui grande relevância para a utilização em aplicações na área de terapia celular. Trata-se de um modelo de biorreator com tecnologia *single-use*, o que facilita a validação do bioprocesso. A agitação do biorreator com movimento ondulatório é suficiente para proporcionar adequada aeração do meio de cultivo para a expansão de CTMs. Além disso, o modo de agitação não é agressivo às células, não ocorre formação de bolhas e choque com impelidor.

Até o momento, apenas três trabalhos abordam o cultivo de CTMs em biorreator com movimento ondulatório. Esses estudos deixaram lacunas no que se refere à condução da etapa de adesão realizada na Cellbag. Também não há informação suficientemente detalhada sobre dados de agitação da plataforma do biorreator e formação de depósito de microcarregadores na superfície interna da Cellbag, fatores que têm muita influência na expansão das CTMs.

Nesse sentido, a presente tese se propôs em preencher as lacunas existentes com relação ao cultivo de CTMs em biorreator com modelo de agitação ondulatório, com objetivo de melhorar o fator de expansão da CTM-CU, e assim tornar esse biorreator competitivo para emprego em bioprocessos com CTMs. Nesta tese foram abordados os dois problemas enfrentados no cultivo de CTMs no biorreator com movimento ondulatório (fase de adesão ineficiente das CTMs aos microcarregadores e depósito de partículas na superfície interna da Cellbag), através da identificação de limitações operacionais nas fases de adesão e expansão da CTM-CU no Biorreator Wave™ e da caracterização dos tipos de depósito de microcarregadores na superfície interna da Cellbag.

Visando à resolução do problema de formação de depósitos de microcarregadores, foi proposto o emprego de um suporte, desenvolvido nesta tese, para ser colocado sobre a plataforma de agitação do biorreator e modificar o formato da Cellbag, alterando o escoamento do fluido contido na Cellbag e, assim, contornando a nociva formação dos depósitos. Nesta tese, também foram realizados estudos de expressão gênica das CTM-CU e quantificação de VEs derivadas das CTM-CU em cultivos no Biorreator Wave™.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

A presente tese tem como objetivo avaliar estratégias de operação para melhorar o desempenho do Biorreator Wave™ no cultivo de Células-Tronco Mesenquimais derivadas de Cordão Umbilical (CTM-CU), mantendo os requisitos de qualidade das CTMs para fins terapêuticos.

3.2. Objetivos específicos

- a. Identificar a origem de limitações operacionais nas fases de adesão e crescimento da CTM-CU que levam aos baixos fatores de expansão no Biorreator Wave™.
- b. Efetuar modificações na operação do Biorreator Wave™ visando à mitigação das limitações operacionais e, conseqüentemente, o melhoramento do rendimento da expansão da CTM-CU.
- c. Avaliar o desempenho do Biorreator Wave™ no cultivo da CTM-CU em termos de: capacidade proliferativa; potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos; identidade imunofenotípica e expressão gênica.
- d. Avaliar o desempenho do Biorreator Wave™ com relação à produção de vesículas extracelulares derivadas da CTM-CU.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Visão geral do trabalho experimental

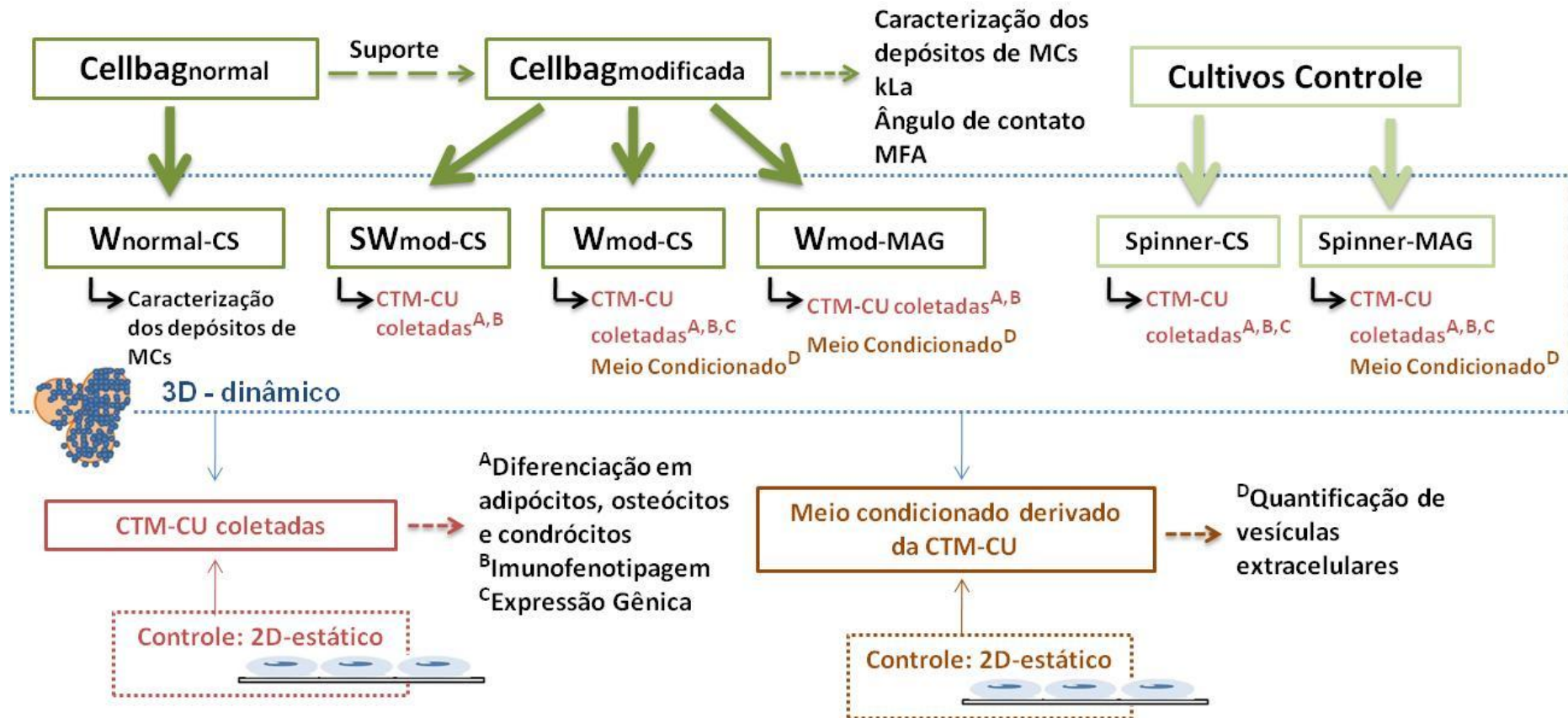
Na presente tese, o estudo da expansão da CTM-CU no Biorreator Wave™ abrangeu 2 cultivos realizados com a Cellbag em posição normal de operação e 10 cultivos com o formato da Cellbag modificado, através do uso do suporte desenvolvido neste trabalho. Foram utilizados como suporte de ancoramento da CTM-CU, o microcarregador comercial CultiSpher-S® e o microcarregador MAG, desenvolvido no LATECC (SUAZO; MOREIRA; WODEWOTZKY, 2016; WODEWOTZKY, 2015).

Com a finalidade de ter uma referência de comparação ou controle, foram realizados cultivos controle da CTM-CU em frasco spinner, com os microcarregadores CultiSpher-S® (duplicata) e MAG (duplicata). As CTM-CU coletadas ao término dos cultivos no Biorreator Wave™ e frasco spinner foram avaliadas através de análise de diferenciação celular, imunofenotipagem e expressão gênica, sendo a condição controle a CTM-CU expandida em frasco de cultura.

Foi realizada análise de quantificação de vesículas extracelulares presentes no meio condicionado derivado da CTM-CU ao término dos cultivos no Biorreator Wave™ e frasco spinner, sendo a condição controle o meio condicionado derivado da CTM-CU expandida em frasco de cultura.

Na Figura 9 se apresenta esquematicamente a estrutura do conjunto de experimentos de cultivo da CTM-CU e análises bioquímicas, relacionadas às CTM-CU coletadas dos cultivos e ao meio condicionado derivado da CTM-CU.

Figura 9. Estrutura geral do conjunto de experimentos de cultivo da CTM-CU e principais análises realizadas na presente tese.



MCs: microcarregadores. **MFA:** Microscopia de Força Atômica. **CS:** CultiSpher-S[®]. **MAG:** microcarregador de alginato e gelatina. **W_{normal-CS}:** Cultivos com CultiSpher-S[®] no Biorreator Wave[™], sem alteração na Cellbag. **SW_{mod-CS}:** Cultivos com CultiSpher-S[®], com fase de adesão em frasco Spinner e expansão no Biorreator Wave[™], com alteração na Cellbag. **W_{mod-CS}:** Cultivos com CultiSpher-S[®], com fase de adesão e expansão no Biorreator Wave[™], com alteração na Cellbag. **W_{mod-MAG}:** Cultivos com MAG, com fase de adesão e expansão no Biorreator Wave[™], com alteração na Cellbag. **Spinner-CS:** Cultivos com CultiSpher-S[®], com fase de adesão e expansão em frasco spinner. **Spinner-MAG:** Cultivos com MAG, com fase de adesão e expansão em frasco spinner.

4.2. Célula-Tronco Mesenquimal utilizada nesta tese

Foi utilizada Célula-Tronco Mesenquimal humana proveniente de cordão umbilical, designada pela abreviatura CTM-CU, cedida pela Dra. Karen de Lima Prata do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto - Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular - Processo HCRP 920/2009).

4.3. Procedimento típico seguido na realização dos cultivos da CTM-CU

Todos os procedimentos de manipulação das células e preparo de material, para os cultivos que serão descritos, foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares - LATECC (Nível de Biossegurança NB2 - certificado CTNBio: Processo SEI nº: 01250.018094/2017-4; extrato de parecer técnico nº 5.899/2018), em câmara de biossegurança Classe II (LABCONCO Purifier Class II – Biosafety Cabinet – Delta Series, Labconco Corporation, Missouri, EUA).

4.3.1. Descongelamento e ativação da CTM-CU

As CTM-CU foram preservadas em criotubos com meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino (HyClone®, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), em nitrogênio líquido (-196 °C). Cada criotubo continha 10^6 células em 1 mL do meio de congelamento descrito.

O meio de cultivo empregado em todos os procedimentos de cultivo foi α -MEM (Minimum Essential Medium – Gibco - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) sem vermelho de fenol suplementado com glicose (5,55 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), glutamina (2,5 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), arginina (2,5 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), antibiótico (1% v/v) (Penicilina: 10.000 U/mL e Estreptomicina: 10.000 μ g/mL) (Gibco - HyClone®, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), soro fetal bovino (10% v/v) (HyClone®, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e tampão hepes (10,9 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). O pH foi ajustado entre 6,9 - 7,3. O meio de cultivo com adição de suplementos foi filtrado através de membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno) com poro de 0,22 μ m (Millipore, Massachusetts, EUA).

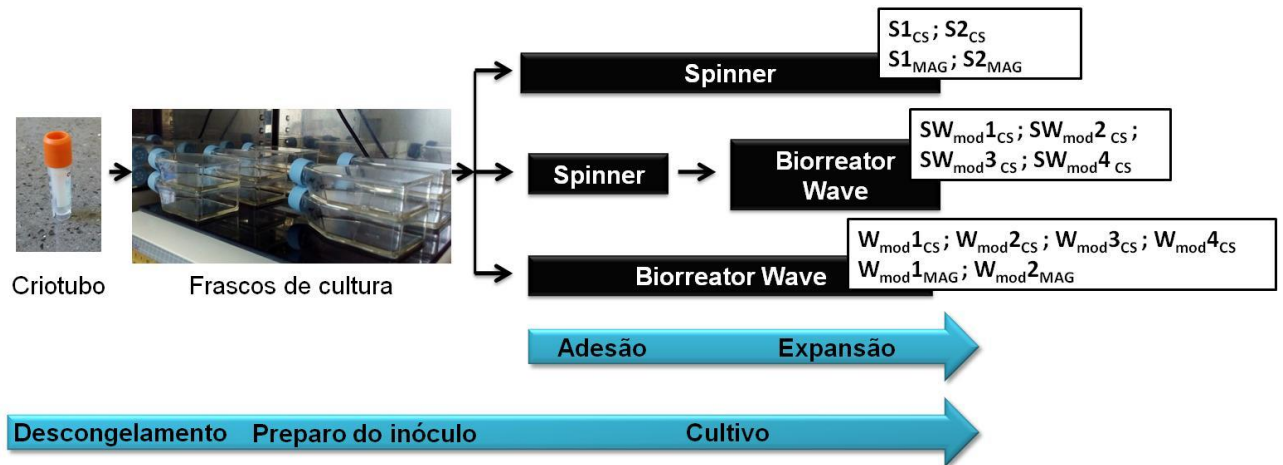
O preparo do inóculo consistiu no descongelamento do criotubo contendo as CTM-CU e posterior cultivo das mesmas em frascos de cultura de 75 cm² (superfície tratada - Corning, NY, EUA) a fim de atingir o número de células necessárias para dar início ao cultivo em biorreator. O descongelamento das células foi realizado

transferindo-se o conteúdo do criotubo para tubo de centrifuga de plástico estéril contendo 9 mL de meio de cultivo, centrifugado à 400 g por 5 min. O pellet foi ressuspensão em meio de cultivo e, a seguir, transferido para frasco de cultura de 75 cm², armazenado em incubadora com 5% de CO₂, a 37 °C (Thermo Fisher Scientific, EUA).

O inóculo era preparado a partir do tratamento enzimático dos frascos de cultura com Tryple™ Express 1x (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) para a desadesão das células. Em seguida, a suspensão de células era centrifugada, o pellet ressuspensão e, a seguir, fazia-se a contagem de células em suspensão para inocular a quantidade desejada de células nos biorreatores (apresentada na Tabela 3).

Nos cultivos em frasco spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}, as CTM-CU foram inoculadas no reator na sexta passagem. Na Figura 10 se descreve o procedimento seguido nos cultivos com fases de adesão e de expansão em frasco spinner, fase de adesão em frasco spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™ e fases de adesão e de expansão no Biorreator Wave™.

Figura 10. Esquema do procedimento adotado na realização dos cultivos da CTM-CU no Biorreator Wave™ e em frasco spinner.



Fonte: Acervo pessoal.

4.4. Condições utilizadas nos cultivos da CTM-CU no Biorreator Wave™ e em frasco Spinner

Na Figura 11 está apresentado o Biorreator Wave™, com seus acessórios, e o frasco spinner utilizados nos cultivos da CTM-CU. Durante a fase de adesão das CTM-CU aos microcarregadores, foram retiradas amostras com até 10 h e a cada 24 h durante a fase de crescimento. Na Figura 12 se descreve esquematicamente o

procedimento de tratamento das amostras. A Tabela 3 apresenta as condições de operação detalhadas para os cultivos realizados.

4.4.1. Cultivos no Biorreator Wave™

As Cellbags empregadas eram de 2 L (GE Healthcare, Illinois, EUA), com volume de trabalho recomendado entre 0,2 a 0,8 L (GE, 2010). Os cultivos Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} foram conduzidos com a Cellbag modificada, operada dentro do suporte, projetado e construído nesta tese, conforme descrito no item 5. O módulo de controle Wavepod™ II possibilitou monitoramento de pH e oxigênio dissolvido e controle da composição da corrente de entrada de gás na Cellbag (5-10%CO₂/ar). A corrente de entrada de CO₂/ar foi mantida em 0,02 L/min durante a fase de adesão e 0,04 L/min durante a fase de expansão. A temperatura foi controlada em 37°C através da plataforma de agitação. Também através da plataforma de agitação, foi feito o controle da agitação durante os cultivos, entre 2 - 33 rpm e angulação do balanço da plataforma entre 2° - 7°. As condições de operação detalhadas estão descritas na Tabela 3.

4.4.1.1. Cultivos Wave_{normal}

Nos cultivos Wave_{normal}, as fases de adesão e expansão foram realizadas na Cellbag em posição normal de operação. Foram inoculadas 1×10^7 células, na relação de 30 células por microcarregador. Foi utilizado microcarregador CultiSpher-S® na concentração de 4,16 gMC/L (adesão) e 0,8 gMC/L (expansão). A fase de adesão foi realizada com 100 mL e agitação da plataforma de 2 rpm/2°. Com 24 h, foi adicionado meio de cultivo para obter volume final de aproximadamente 500 mL.

4.4.1.2. Cultivos Spinner-Wave_{mod}

Nos cultivos Spinner-Wave_{mod}, a fase de adesão foi realizada em spinner de 500 mL, com volume de trabalho de 200 mL. A concentração inoculada de CTM-CU, relação do número de células por microcarregador, concentração de microcarregador e agitação empregada para cada cultivo estão descritos na Tabela 3. Com 24 h de cultivo, o inóculo foi transferido do spinner para a Cellbag com o formato modificado (operada dentro do suporte), com adição de meio de cultivo para obter volume final de aproximadamente 600 mL.

4.4.1.3. Cultivos Wave_{mod}

Nos cultivos Wave_{mod}, o volume de trabalho durante a fase de adesão realizada na Cellbag, com o formato modificado (operada dentro do suporte), foi de 75 mL (W_{mod1CS}) e 50 mL (W_{mod2CS} , W_{mod3CS} , W_{mod4CS} , $W_{mod1MAG}$ e $W_{mod2MAG}$). A fase de

adesão foi realizada com agitação da plataforma de 2 rpm/2° para o cultivo $W_{mod}1_{CS}$. Durante a fase de adesão nos demais cultivos $Wave_{mod}$, a Cellbag foi mantida sem agitação, inserida no suporte, dentro de incubadora para controle da temperatura. Com 24 h, foi adicionado meio de cultivo para obter volume final de aproximadamente 600 mL. A concentração inoculada de CTM-CU, relação do número de células por microcarregador, concentração de microcarregador e agitação empregada para cada cultivo estão descritos na Tabela 3.

4.4.2. Cultivos em frasco Spinner

Empregou-se frasco spinner de 500 mL de capacidade com impelidor esférico (Bellco, Nova Jersey, EUA) e agitador magnético (Thermolyne Cellgro 45600 Multi-Place Magnetic Stirrer, Iowa, EUA). A superfície interna do frasco spinner antes dos cultivos foi recoberta por Sigmacote[®], conforme especificação do fabricante (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). O frasco spinner e agitador magnético foram mantidos em incubadora umidificada a 37°C com controle de CO₂ (ThermoForma, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Foram realizadas trocas de meio de cultivo para evitar esgotamento de nutrientes e níveis inibitórios de metabólitos tóxicos. As condições de operação detalhadas estão descritas na Tabela 3.

4.4.2.1. Cultivos $S1_{CS}$ e $S2_{CS}$

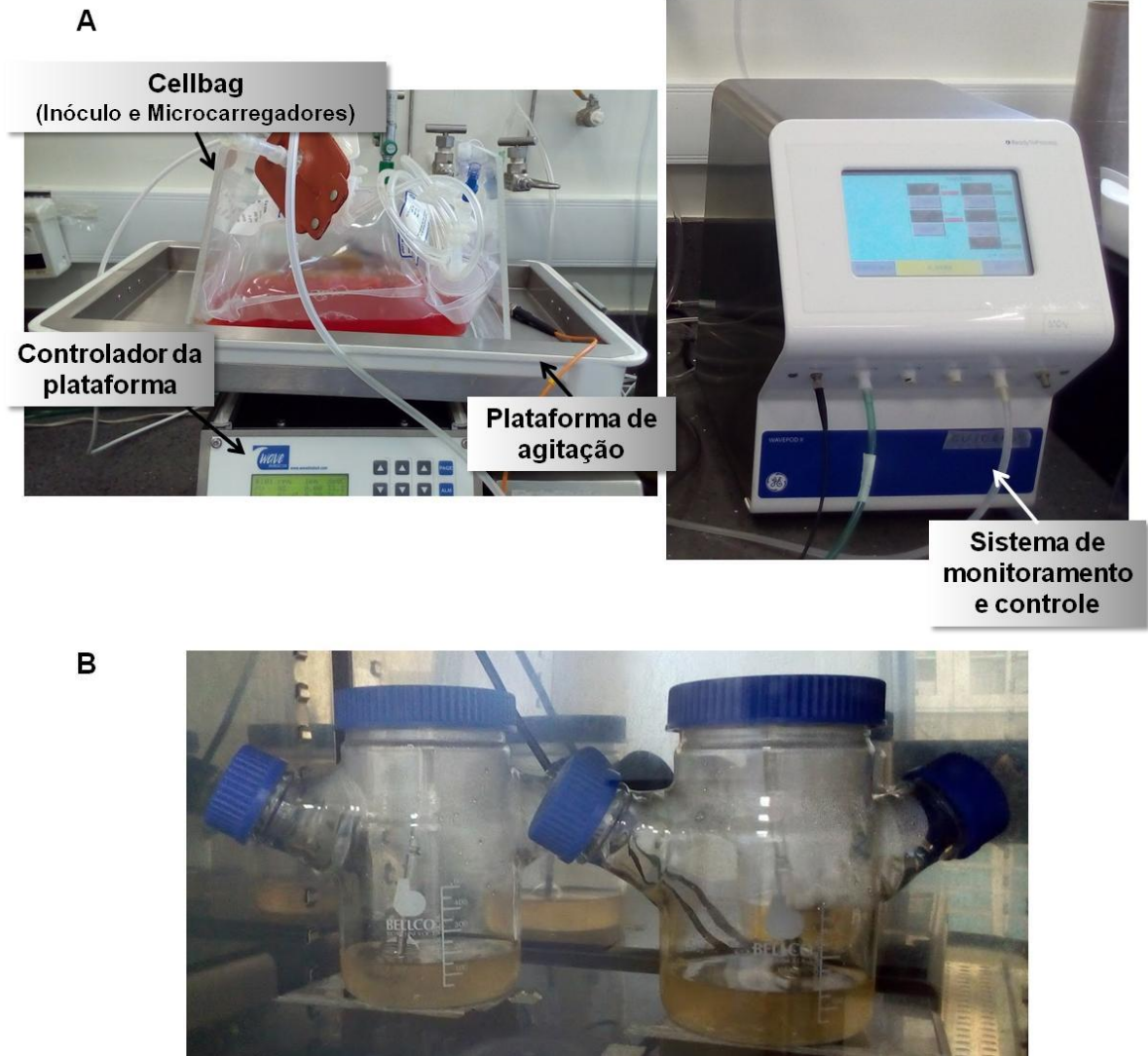
Nos cultivos $S1_{CS}$ e $S2_{CS}$, as fases de adesão e expansão foram realizadas em spinner com volume de trabalho de 200 mL. Foram inoculadas $3,33 \times 10^6$ células, na relação de 30 células por microcarregador. Foi utilizado microcarregador CultiSpher-S[®] na concentração de 0,7 gMC/L. Com 144 h, foi realizada troca de 25% do meio de cultivo por meio fresco. A fase de adesão foi realizada com agitação intermitente, conforme apresentado na Tabela 3.

4.4.2.2. Cultivos $S1_{MAG}$ e $S2_{MAG}$

Nos cultivos $S1_{MAG}$ e $S2_{MAG}$, as fases de adesão e expansão foram realizadas em spinner com volume de trabalho de 150 mL. Foram inoculadas $1,54 \times 10^6$ células, na relação de 10 células por microcarregador. Foi utilizado microcarregador MAG na concentração de 2,5 gMC/L. Com 168 e 216 h, foram realizadas trocas de 25% do meio de cultivo por meio fresco. A fase de adesão foi realizada com agitação intermitente, conforme apresentado na Tabela 3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 11. (A): Biorreator Wave™ e equipamentos auxiliares utilizados nos cultivos da CTM-CU. Plataforma 2/10 com Cellbag de 2 L operada dentro do suporte e módulo de Controle Wavepod™ II. (B): Frasco spinner de 500 mL utilizado nos cultivos da CTM-CU.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 12. (A) Esquema do procedimento de tratamento das amostras e análises realizadas durante os cultivos da CTM-CU no Biorreator Wave™ e frasco spinner. (B) Análises realizadas nas CTM-CU coletadas ao término dos cultivos e (C) análises realizadas no meio condicionado derivado da CTM-CU.

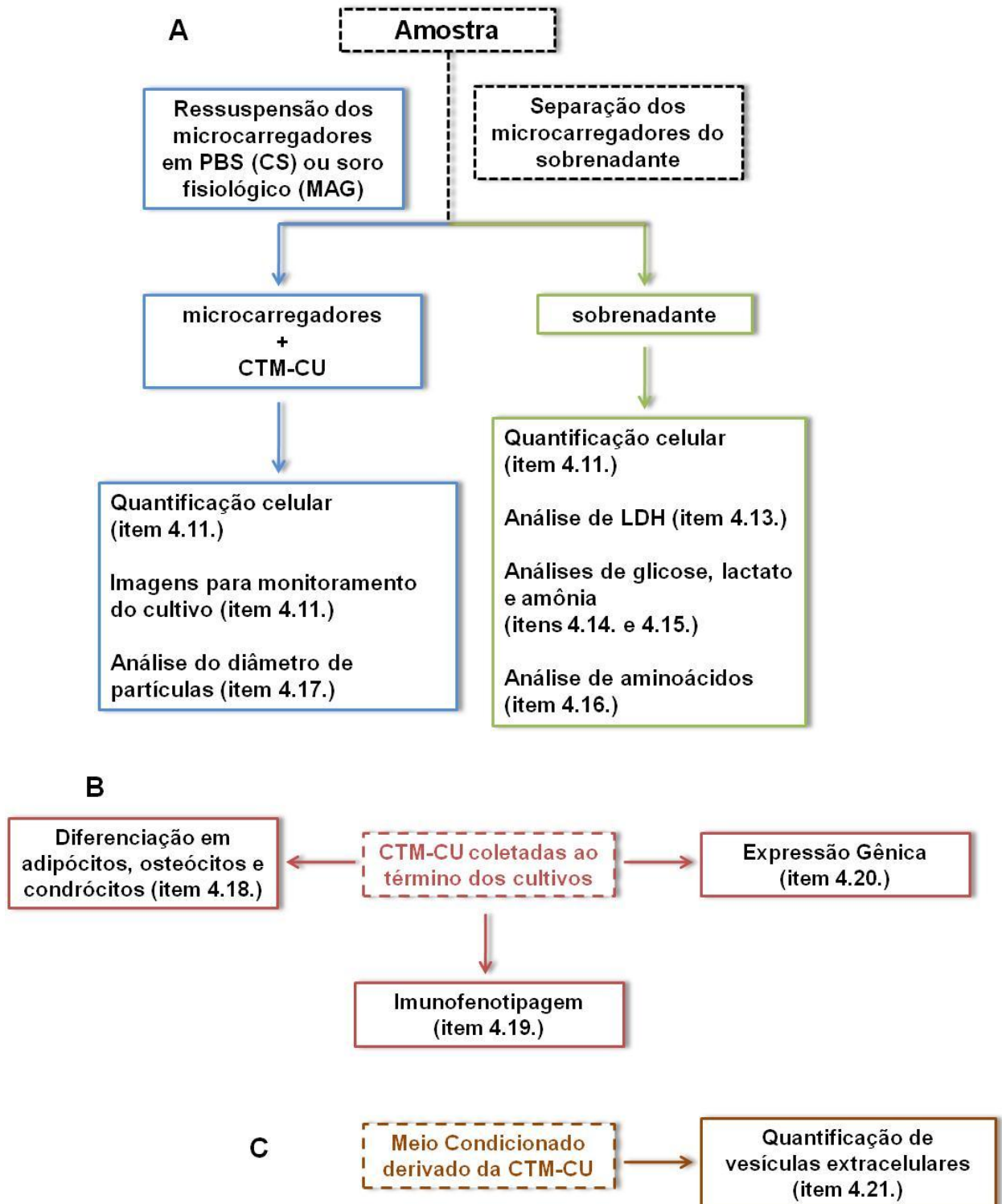


Tabela 3. Condições de operação utilizadas nos cultivos da CTM-CU realizados em frasco Spinner, sistema Spinner- Biorreator Wave™ e no Biorreator Wave™, com o formato da Cellbag modificado.

Parâmetro	Spinner		Spinner-Wave _{mod}				Wave _{mod}				
	S1,S2 _{CS}	S1;S2 _{MAG}	SW1 _{CS}	SW2 _{CS}	SW3 _{CS}	SW4 _{CS}	W1 _{CS}	W2 _{CS}	W3 _{CS}	W4 _{CS}	W1;W2 _{MAG}
Microcarregador	CultiSpher-S®	MAG	CultiSpher-S®				CultiSpher-S®				MAG
X ₀ (cel/mL) (adesão/expansão x10 ⁴)	1,7/1,7	1,0/1,0	5,0/1,7	5,0/1,7	5,0/1,7	5,0/1,7	13,3/1,7	20,0/1,7	11,0/0,9	12,4/1,0	18,0/1,5
gMC/L (adesão)	0,7	2,5	2,1	2,1	2,1	2,1	5,5	8,3	8,3	25,0	30,0
gMC/L (expansão)	0,7	2,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	2,1	2,5
Volume (mL) (adesão/expansão)	200/200	150/150	200/600	200/600	200/600	200/600	75/600	50/600	50/600	50/600	50/600
Tempo de adesão (h)	9	9	10	9	9	9	9	24	24	24	24
Agitação adesão*	int. até 3h	int. até 3h	int. até 10h	int. até 9h	int. até 9h	int. até 3h	2rpm/2°	estático	estático	estático	estático
Agitação expansão (rpm/°) (h)	50	50	20/4° ⁽⁴⁸⁾ 27/4° ⁽⁹⁶⁾ 24/4° ⁽¹⁶⁸⁾ 27/3° ⁽²⁴⁰⁾	15/7° ⁽⁴⁸⁾ 15/5° ⁽⁷²⁾ 24/4° ⁽¹⁹²⁾ 26/3° ⁽²¹⁶⁾ 27/3° ⁽²⁴⁰⁾	15/7° ⁽⁴⁸⁾ 24/4° ⁽¹⁶⁸⁾ 27/3° ⁽²⁴⁰⁾	15/7° ⁽⁴⁸⁾ 24/4° ⁽¹⁶⁸⁾ 27/3° ⁽²¹⁶⁾ 33/2° ⁽²⁴⁰⁾	5/3° ⁽²⁴⁾ 24/4° ⁽²⁴⁰⁾	24/4° ⁽²⁴⁰⁾	24/4° ⁽²⁸⁸⁾	24/4° ⁽³¹²⁾	W1:24/4° ⁽¹⁶⁸⁾ 25/3° ⁽³¹²⁾ W2:25/3° ⁽²¹⁶⁾ 24/3° ⁽³¹²⁾
células/MC	30	7	30	30	30	30	30	30	16	6	10
Tempo de operação (d)	7	11	10	10	10	10	10	10	12	13	13

* int.- regime de agitação intermitente: 50 rpm por 0,5 min a cada 15 min até 1 h; 50 rpm por 0,5 min a cada 30 min no restante do período de agitação intermitente.

4.5. Cellbag inserida dentro do suporte para evitar segregação dos microcarregadores

O formato da Cellbag foi modificado mediante a utilização de um suporte de acrílico que encurtava longitudinalmente a Cellbag, elevando (verticalizando) as laterais da mesma e, assim, inibindo a presença de regiões nos seus extremos onde ocorriam os depósitos de microcarregadores tipo duna. Esse tipo de depósito se assemelha ao processo em que as ondas do mar carregam material flutuante que, quando atingem a praia, são depositados, permanecendo retidos na areia. Os detalhes do suporte de acrílico e suas dimensões estão apresentados na Figura 13.

Na Figura 14 se mostra o formato da Cellbag sobre a plataforma tal como fornecida pelo fabricante do equipamento e também depois de inserida no suporte. Como será explicado no capítulo de resultados, essa modificação visava eliminar a morte celular causada pela segregação (deposição) de microcarregadores colonizados com CTM durante os cultivos. Com o balanço da plataforma, o meio de cultivo líquido era impulsionado junto com os microcarregadores para os extremos da Cellbag. Com o retorno do meio, vários microcarregadores ficavam retidos devido ao contato com o plástico da Cellbag, permanecendo fora da suspensão.

4.6. Determinação do nível de depósito de microcarregadores

A fim de possibilitar análise da intensidade do depósito de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, na região de borda líquido-gás, foram estipulados níveis de depósito, determinados por inspeção visual da Cellbag no momento anterior às amostragens diárias: Nível 0: ausência de depósito de microcarregadores; Nível 1: pequenos pontos de depósito; Nível 2: presença de faixas com fina camada de depósito (espessura próxima a 1 mm); Nível 3: presença de faixas com camada de depósito superior a 1 mm de espessura.

4.7. Determinação do coeficiente de transferência de oxigênio - $k_L a$

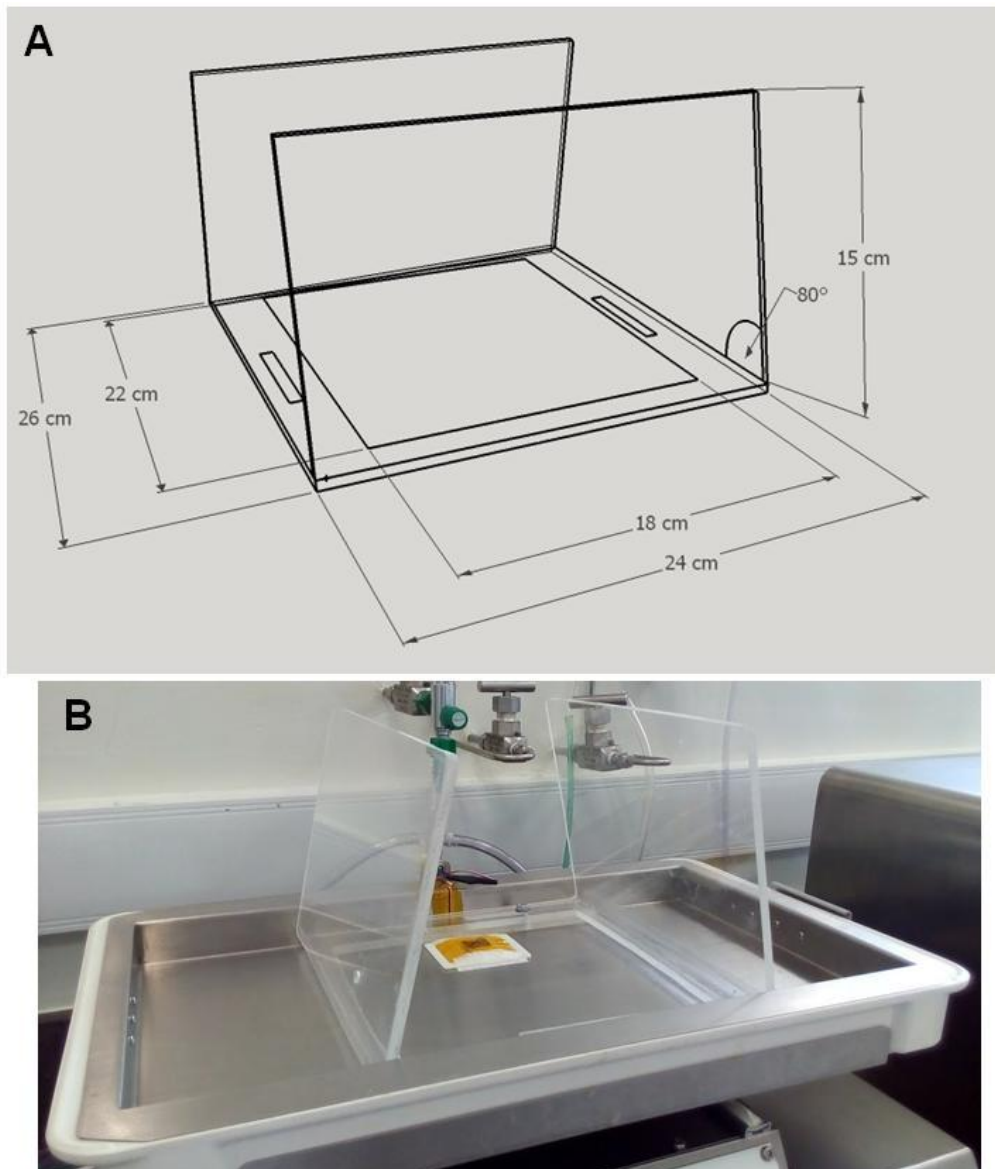
Para determinar a influência da modificação do formato da Cellbag no coeficiente de transferência de oxigênio ($k_L a$) foram realizadas medidas de oxigênio dissolvido. O $k_L a$ foi obtido através do método dinâmico (LÖFFELHOLZ et al., 2013) para os parâmetros utilizados nos cultivos no Biorreator Wave™ (0,067 vvm; 24rpm/4°; aeração com ar). A remoção do oxigênio dissolvido no meio de cultivo foi realizada através da passagem de nitrogênio pelo “espaço de cabeça” da Cellbag. Com a leitura de oxigênio dissolvido próxima à zero, era iniciada a injeção de ar na Cellbag, e as leituras de oxigênio dissolvido monitoradas através de um sensor de oxigênio dissolvido (DOOPT-Probe - GE Healthcare, Illinois, EUA). O acompanhamento da

elevação da concentração de oxigênio dissolvido no meio foi realizado em triplicata. A determinação do $k_L a$ foi realizada utilizando a Equação 3 em sua forma integrada.

$$k_L a \times dt = \frac{dC_L}{(C_L^* - C_L)} \therefore k_L a \times (t - t_0) = \ln \frac{(C_L^* - C_{L,0})}{(C_L^* - C_L)} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: C_L^* : concentração de saturação de oxigênio no líquido; $C_{L,0}$ concentração de oxigênio no líquido para tempo t_0 ; C_L : concentração de oxigênio no líquido para um tempo t .

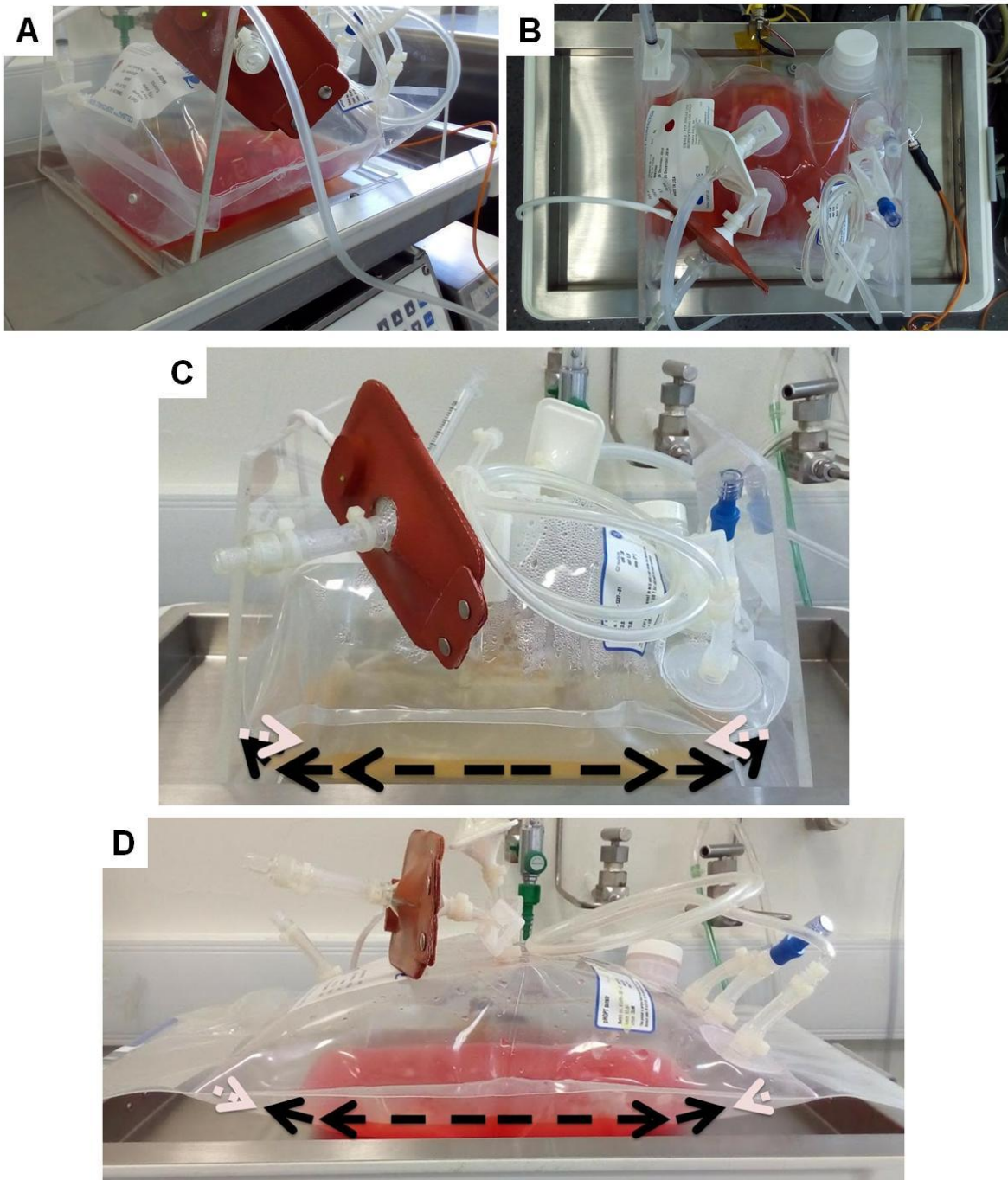
Figura 13. (A): Suporte de acrílico desenhado e construído no LATECC para modificação do formato da Cellbag, visando evitar a segregação dos microcarregadores colonizados com CTM-CU durante os cultivos. (B): Suporte de acrílico posicionado sobre a plataforma de agitação do Biorreator Wave™.



Fonte: Acervo pessoal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 14. (A, B e C) Vista da plataforma com a Cellbag inserida no suporte para elevação das laterais e (D) vista lateral da plataforma com a Cellbag em posição normal de operação. As setas indicam o movimento dos microcarregadores no líquido. Em (C) os microcarregadores são impulsionados para a superfície inferior das extremidades da Cellbag e retornam para o líquido quando a plataforma inclina no sentido oposto (seta branca). Em (D) os microcarregadores são impulsionados para a superfície inferior das extremidades da Cellbag e não retornam para o líquido quando a plataforma inclina no sentido oposto, assim, forma-se uma zona de depósito de microcarregadores (região de encontro das setas branca e preta).



Fonte: Acervo pessoal.

4.8. Ângulo de contato – Teste de molhabilidade

As análises de ângulo de contato foram realizadas na Embrapa Instrumentação. Foram cortadas amostras do plástico de uma Cellbag nova (não empregada em cultivo) e de uma Cellbag após ser utilizada em cultivo da CTM-CU, de onde foram retiradas amostras da região central e da região lateral do plástico (região de borda líquido-gás). As amostras da Cellbag foram mantidas em dessecador, protegidas da luz, por 24 h antes do teste de molhabilidade. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada posição descrita anteriormente, utilizando água ultra pura, meio de cultivo contendo 10% v/v SFB e meio condicionado obtido ao término do cultivo da CTM-CU.

Para averiguar se ocorria deposição de proteínas na superfície interna da Cellbag durante o cultivo, amostras do plástico de uma Cellbag após cultivo da CTM-CU foram mantidas imersas em tripsina-EDTA 0,25% (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) durante 30 minutos. Após, as amostras foram lavadas e secas em dessecador, protegidas da luz, para realizar o teste de molhabilidade, em triplicata.

Foi utilizada seringa de 10 μ L para gerar as gotículas (Hamilton Syringes, Nevada, EUA) e o equipamento KSV CAM 101 (KSV instruments, Finlândia) para aquisição das imagens da interação entre a gotícula e a superfície interna da Cellbag e posterior obtenção do ângulo de contato por análise óptica.

4.9. Microscopia de Força Atômica - MFA

As análises de microscopia de força atômica foram realizadas na Embrapa Instrumentação. Para análise de MFA, amostras do plástico de uma Cellbag nova (não empregada em cultivo), de uma Cellbag após ser utilizada em cultivo da CTM-CU e de uma Cellbag após emprego em cultivo da CTM-CU e tratada com tripsina-EDTA 0,25%, foram mantidas em dessecador, protegidas da luz, por 24 h antes da análise de MFA. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, em triplicata para cada amostra. As amostras foram avaliadas utilizando ponta de silício (Silicon AFM Probe - TAP 150-G, TED Pella Inc, Califórnia, EUA) em áreas de 10 x 10 μ m², através do Nanosurf EasyScan 2 (Nanosurf, Liestal, Suíça). As imagens obtidas foram tratadas no *software* Gwyddion 2.52 (Gwyddion developers, Bruno, República Checa).

4.10. Preparação dos microcarregadores (MCs)

4.10.1. Microcarregador CultiSpher-S®

Foi utilizado o microcarregador macroporoso CultiSpher-S® (PerCELL Biolytica, Escânia, Suécia). O microcarregador CultiSpher-S® é feito a base de gelatina, o diâmetro de partícula varia entre 130 e 380 µm e apresenta 8×10^5 partículas por grama de massa seca (HUNT et al., 2011). A massa de microcarregador necessária foi hidratada em PBS (*Phosphate Buffer Solution: NaCl, 8 g/L; KCl, 0,2 g/L; Na₂HPO₄, 1,15 g/L e K₂HPO₄, 0,2 g/L, pH ajustado entre 7,2 - 7,4, esterilizado através de filtração em membrana PVDF com poro de 0,22 µm*). Os microcarregadores foram esterilizados de acordo com as especificações técnicas do fabricante (PerCELL Biolytica, Escânia, Suécia).

4.10.2. Microcarregador a base de Alginato e Gelatina - MAG

O Microcarregador a base de Alginato e Gelatina (MAG) foi produzido conforme metodologia desenvolvida por Wodewotzky (2015), através da mistura de solução de alginato de sódio 2% m/v (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e gelatina porcina 5% m/v (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em proporção 1:1, contendo 50 mM de EDC (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). A solução foi mantida sob agitação constante durante 10 h e, após, pulverizada através de pistola pulverizadora em nitrogênio líquido. As micropartículas formadas foram liofilizadas (Freezone 6 - Labconco, Missouri, EUA) até secagem completa. Os microcarregadores com diâmetro entre 250 - 355 µm foram reticulados através de solução contendo EDC/NHS (10:1), CaCl₂ 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), dissolvidos em tampão MES (50 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), e mantidos a 4 °C durante 4 h (WODEWOTZKY, 2015). Após, os microcarregadores foram lavados com soro fisiológico para então serem esterilizados por autoclavagem (121°C durante 30 minutos) (Primatec - Equipamentos, SP, BR). O MAG apresenta poros com cerca de 54 µm e 6×10^5 partículas por grama de massa seca (WODEWOTZKY, 2015).

4.11. Quantificação da densidade e viabilidade celular

As determinações da densidade e viabilidade celular durante a fase de preparo do inóculo e para quantificar o número de células no sobrenadante dos biorreatores, foram realizadas pelo método de exclusão por azul de tripan (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Esse método foi empregado nos cultivos com o microcarregador MAG para a quantificação de células aderidas aos microcarregadores, devido à degradação do MAG pela solução de solubilização utilizada no método MTT (item 4.11.1.). O método de exclusão por azul de tripan

consiste na contagem de células coradas e não coradas no hemocitômetro (câmara de Neubauer) (LO-Laboroptik, Lancing, Inglaterra). O erro obtido na concentração celular é em torno de 10% (BUTLER, 2004).

Adicionava-se à amostra o corante azul de tripan, o qual atravessava a membrana das células não viáveis, deixando-as coradas. As células viáveis não permitiam a entrada do corante e permaneciam sem corar. A densidade de células viáveis foi obtida pela Equação 4. Foram contabilizadas 6 câmaras de Neubauer para cada amostra. Os dados de concentração celular foram apresentados como média e desvio padrão.

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\sum N}{\sum Q} \times \frac{1}{10^{-4} \text{ mL}} \times \text{fd} \quad [\text{cel.mL}^{-1}] \quad \text{Equação 4}$$

Onde: $\sum N$: Somatório do número de células viáveis em cada quadrante de contagem (Q); $\sum Q$: Somatório do número de quadrantes contados; fd: fator de diluição da solução com amostra e corante azul de tripan.

4.11.1. Quantificação de células viáveis pelo método MTT

A quantificação de células viáveis aderidas aos microcarregadores nos cultivos empregando microcarregador Cultispher-S[®] foi realizada pelo método MTT. Para aplicar o método MTT (kit Sigma - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizou-se uma curva de calibração relacionando a densidade celular com a medida espectrofotométrica da absorbância da solução. O reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi empregado para determinar com espectrofotômetro (Multiskan FC - Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a concentração celular viável verificada pela coloração da solução, que passava de amarelo (MTT) para roxo (cristais de formazan), como resultado da ação redutora da enzima mitocondrial desidrogenase sobre o MTT. Alíquota de 500 μL da amostra lavada com PBS era destinada a análise de viabilidade celular por MTT. Adicionava-se 50 μL de solução de MTT, com concentração final de 0,5 mg/mL, e deixava-se em incubadora a 37 °C por 4 h.

Após, adicionavam-se 500 μL de solução de 10% de Triton[™] X-100 em isopropanol (kit Sigma - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para solubilizar os cristais de formazan e, então, agitava-se em vórtex e centrifugava-se para separar o pellet contendo microcarregadores e células. O sobrenadante da amostra e o branco (alíquota de PBS com tratamento idêntico à amostra) foram analisados em placa de 96 poços, em triplicata, em espectrofotômetro. A leitura era realizada em 570 nm. Assim, com a leitura da absorbância da amostra e do branco, tinha-se o dado da viabilidade celular dada em função da atividade mitocondrial. Os dados de concentração celular foram apresentados como média e desvio padrão.

4.12. Procedimentos de recuperação das CTM-CU aderidas aos microcarregadores ao término dos cultivos

Para recuperação das células ao término dos cultivos realizados, aplicou-se a enzima Tryple™ Express (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) 10 vezes concentrada (Tryple10x). Nos cultivos em frasco spinner, após decantação dos microcarregadores, o meio de cultivo foi removido do spinner e os microcarregadores transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL e lavados com PBS.

Nos cultivos SW_{mod} e W_{mod} , o conteúdo da Cellbag era transferido para frasco schott e então o sobrenadante removido para outro frasco schott através da passagem do meio líquido por membrana de 100 μ m (para retenção dos microcarregadores). O volume final restante contendo os microcarregadores era transferido para tubos de centrífuga de 50 mL e, em seguida, realizavam-se os tratamentos de lavagem com PBS. A Figura 15 apresenta o sistema utilizado para recuperação das células, com frasco schott acoplado à Cellbag.

Após a lavagem com PBS, era adicionada a enzima Tryple™ Express 10x. Os tubos contendo os microcarregadores foram mantidos sob agitação manual em banho-maria a 37°C até completa digestão dos microcarregadores. Após, os tubos eram centrifugados e os pellets coletados para contagem das células recuperadas e posterior armazenamento, em nitrogênio líquido, em criotubos contendo 10^6 células em 1 mL de meio de congelamento.

Figura 15. Sistema utilizado para recuperação das CTM-CU ao término dos cultivos no Biorreator Wave™: 1) Passagem do meio de cultivo da Cellbag contendo os microcarregadores para o Frasco 1; 2) Passagem do meio de cultivo do Frasco 1 para o Frasco 2 através de membrana de 100 μ m, para retenção dos microcarregadores no Frasco 1.



Fonte: Acervo pessoal.

4.13. Quantificação de lise celular pelo método LDH

A quantificação de lise celular foi realizada pelo método LDH aplicado nas alíquotas do sobrenadante das amostras. Foram adicionadas alíquotas iguais de solução de ácido láctico, de NAD⁺ e de cloreto de tetrazólio (kit Sigma, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). O NAD⁺ era reduzido pela LDH liberada pelas células no sobrenadante (células não viáveis) à NADH. O NADH era então utilizado na conversão estequiométrica do corante tetrazólio, formando um derivado de formazan vermelho. Após, a solução foi centrifugada (400 g durante 5 minutos) para sedimentação de restos celulares e o sobrenadante era destinado para análise, utilizando placa de 96 poços, em espectrofotômetro (Multiskan FC - Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). As medidas foram realizadas em triplicata, no comprimento de onda de 492 nm. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão.

4.14. Análise de glicose e lactato

As análises de glicose e lactato foram realizadas através do analisador bioquímico YSI (YSI 7100MBS, Ohio, EUA), em alíquota obtida do sobrenadante da amostra.

4.15. Análise de amônia

As análises de amônia foram realizadas no Centro de Terapia Celular - Hemocentro de Ribeirão Preto. Foi utilizado medidor com eletrodo de íon seletivo (ORION 710A - Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Para aplicar esse método foi feita uma curva de calibração com solução padrão de amônia (HX0011-00433 - Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

4.16. Análise de aminoácidos

As análises de aminoácidos foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia proposta por Henrikson e Meredith (HEINRIKSON; MEREDITH, 1984). Alíquotas do sobrenadante das amostras foram destinadas para as análises de CLAE (Waters e2695 Separations Module, Massachusetts, EUA). A preparação das amostras englobou os procedimentos de filtração, secagem, re-hidratação, derivatização e diluição em tampão para injeção no cromatógrafo. O método utilizou fase estacionária constituída pela coluna Pico-tag (60Å, 4 µm, 3.9 mm x 300 mm) (Waters, Massachusetts, EUA) e as fases móveis A (acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, EDTA, água Milli-Q e acetonitrila) e B (água Milli-Q, EDTA e acetonitrila). Foram preparadas soluções padrão de asparagina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e glutamina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para incorporar ao padrão Waters (WAT088122) (Waters, Massachusetts, EUA).

4.17. Diâmetro médio de microcarregadores isolados ou agregados de microcarregadores

Os diâmetros médios de partículas (microcarregadores isolados ou agregados de microcarregadores) foram medidos utilizando o *software* Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Maryland, EUA), através da análise de imagens das amostras coradas com cristal violeta 0,2% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), utilizando microscópio invertido modelo CK30 (Olympus, Tóquio, Japão).

4.18. Análise de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos

As células recuperadas ao término dos cultivos foram induzidas à diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. O processo de diferenciação compreende três etapas: adesão, indução e diferenciação. Tal processo consiste em suplementar o meio de cultivo com indutores específicos para cada tipo de diferenciação.

Para diferenciação em adipócitos, foi utilizado o kit StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, Massachusetts, EUA) e a coloração realizada com aplicação de Sudan II (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) durante 30 minutos. Na diferenciação em osteócitos, empregou-se o kit StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, Massachusetts, EUA) e a coloração realizada com aplicação de nitrato de prata 5% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) durante 30 minutos, protegido da luz. Na diferenciação em condrócitos, foi utilizado o kit StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, Massachusetts, EUA) e a coloração realizada com aplicação de 1% de azul de alciano (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) durante 1 h.

Para adipócitos e osteócitos as células foram inoculadas em placa de 24 poços com superfície tratada (TPP, Trasadingen, Suíça), com 4×10^4 células por poço, em meio contendo 10% v/v de SFB. Após 24 h, 50% do meio de cada poço foi trocado por meio suplementado com indutor de diferenciação. Para condrócitos foi utilizada placa de 24 poços com superfície não tratada (Corning, NY, EUA). De uma solução contendo 1×10^6 cel/mL, foram inoculadas entre 3-4 gotas de 10 μ L por poço, e mantidas em incubadora durante 45 min. Após, foi adicionado meio contendo indutor de diferenciação em condrócitos. As placas de poços foram mantidas em incubadora, a 37°C e 5% de CO₂, durante 14 dias para adipócitos e condrócitos e durante 21 dias para osteócitos, realizando trocas de 50% do meio a cada 3 dias.

4.19. Análise de Imunofenotipagem

As análises de imunofenotipagem foram realizadas no Centro de Terapia Celular - Hemocentro de Ribeirão Preto. As células recuperadas ao término dos cultivos foram armazenadas em criotubos e, posteriormente, descongeladas e cultivadas em frasco de cultura para se obter alíquotas de 200 μ L com mínimo de

$2,5 \times 10^5$ células suspensas em PBS. Foi realizada a imunomarcagem com os seguintes anticorpos monoclonais, durante 20 minutos a temperatura ambiente e em ausência de luz: HLA-DR; CD14; CD29; CD31; CD34; CD44; CD45; CD73; CD90 e CD105. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspendidas em PBS para análise no citômetro de fluxo FACScalibur™ flowcytometer (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA). Foram avaliados 10^4 eventos para cada análise utilizando o *software* CELLQuest™ (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA).

4.20. Análise de padrões de expressão gênica global por ensaios do tipo *microarrays*

A análise de padrões de expressão gênica global foi conduzida no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. As CTM-CU coletadas ao término dos cultivos no Biorreator Wave™ e em frasco spinner, com os microcarregadores CultiSpherS® e MAG, foram destinadas para análise de padrões de expressão gênica global obtidos por ensaios do tipo *microarrays* (micro-arranjos de DNA). Os *microarrays* são slides que contêm sondas, nos quais cada sonda se relaciona a um gene específico. Quanto maior a expressão de um dado gene, maior será o número de ligações na sonda relacionada a esse gene e, conseqüentemente, maior a expressão lida.

A extração do RNA total foi realizada utilizando o RNeasy (Qiagen, Limburgo, Países Baixos), conforme instruções do fabricante. Foram utilizados *microarrays* SurePrint 8x60K Kit (Agilent, Califórnia, EUA). O procedimento englobou as etapas de marcação, hibridação e lavagens (Low Input Quick Amp Labeling Kit One-Color, Agilent, Califórnia, EUA). Os slides foram escaneados pelo equipamento SureScan (Agilent, Califórnia, EUA). A avaliação da qualidade dos experimentos e a identificação dos genes expressos foram realizados pelo *software* Feature Extraction (Agilent, Califórnia, EUA). A análise da expressão diferencial dos genes foi realizada com o *software* GeneSpring (Agilent, Califórnia, EUA).

A variação na expressão gênica de um dado gene 'G' (FC - *fold change*) foi fornecida pela Equação 5. Para facilitar a visualização dos resultados, os dados de expressão gênica também foram apresentados em $\log_2(A_G/C_G)$, onde, quando não houve diferença na expressão de um determinado gene entre o tratamento e o controle, a expressão gênica foi nula. Genes com regulação positiva ($A_G > C_G$, *upregulated*) possuem sinal positivo e genes com regulação negativa ($A_G < C_G$, *downregulated*) possuem sinal negativo.

$$FC = \begin{cases} A_G/C_G \rightarrow A_G/C_G > 1 \\ -1/A_G/C_G \rightarrow 0 < A_G/C_G < 1 \end{cases} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: A_G : Intensidade de expressão de um gene “G” para a amostra (amostra tratamento); C_G : Intensidade de expressão de um gene “G” para o controle (amostra de referência).

4.21. Análise da concentração e distribuição de tamanhos de vesículas extracelulares no meio condicionado derivado da CTM-CU

Alíquotas do meio condicionado obtido ao término dos cultivos da CTM-CU no Biorreator Wave™ e frasco spinner foram destinadas para análise da concentração e distribuição de tamanhos de vesículas extracelulares no NanoSight NS300 (NanoSight, Salisbury, Reino Unido), com 3 capturas de 30 s. As análises no NanoSight foram conduzidas no Instituto de Física de São Carlos - IFSC.

A separação das vesículas extracelulares foi realizada por centrifugação diferencial: 2.600 g por 30 min a 10°C, para remoção de células mortas e corpos apoptóticos, seguido por 14.000 g por 45 min a 10°C para formação do pellet de vesículas extracelulares (CHA et al., 2018). O pellet foi ressuspensão em PBS filtrado em membrana 0,20 µm (Millipore, Massachusetts, EUA).

Conforme apresentado em metodologia proposta por Cha et al. (2018) e Gyorgy et al. (2012), visando garantir que as partículas analisadas no NanoSight não incluíssem possíveis agregados de proteínas, parte do pellet foi ressuspensão em PBS com 3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para digestão das partículas envoltas por camada lipídica (vesículas extracelulares) (CHA et al., 2018; GYORGY et al., 2012).

A concentração de vesículas extracelulares foi obtida pela diferença da leitura obtida da amostra descontando a leitura obtida com a amostra solubilizada em PBS+3%Triton X-100. De cada amostra foi igualmente descontado o número de vesículas quantificadas no meio de cultivo contendo 10% v/v SFB, após o mesmo tratamento de centrifugação diferencial aplicado às amostras.

4.22. Equacionamentos

O crescimento dos cultivos foi expresso pelo fator de expansão celular (FE), apresentado pela Equação 6.

$$FE = \frac{N}{N_i} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: N: número máximo de células aderidas aos microcarregadores; N_i : número inicial de células aderidas aos microcarregadores.

A velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{\max}) foi calculada utilizando a Equação 7. Comumente, as CTMs em cultivo *in vitro* podem apresentar μ_{\max} entre 0,020-0,037 h^{-1} (SCHIRMAIER et al., 2014; SCHOP, 2010). A velocidade específica de crescimento celular é constante e máxima (μ_{\max}) durante a fase de crescimento exponencial.

$$\mu = \mu_{\max} = \ln\left(\frac{N_t}{N_{t_0}}\right) \times \frac{1}{t} \quad [\text{h}^{-1}] \quad \text{Equação 7}$$

O tempo que o cultivo leva para dobrar o número de células é denominado tempo de duplicação (t_d), fornecido pela Equação 8.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad [\text{h}] \quad \text{Equação 8}$$

A relação metabólica aparente entre consumo de glicose e produção de lactato, durante a fase de crescimento, foi determinada pela Equação 9. O consumo específico médio de glicose (q_{glc}) foi determinado pela Equação 10 e a produção específica média de lactato (q_{lac}) através da Equação 11.

$$Y_{\text{lac}/\text{glc}} = -\frac{\Delta \text{lac}}{\Delta \text{glc}} = -\frac{\text{lac}_{(t_2)} - \text{lac}_{(t_1)}}{\text{glc}_{(t_2)} - \text{glc}_{(t_1)}} \quad [\text{mol}_{\text{lac}} \cdot \text{mol}_{\text{glc}}^{-1}] \quad \text{Equação 9}$$

$$q_{\text{glc}} = \frac{1}{\bar{X}_{\text{viáveis}}} \times \frac{\Delta \text{glc}}{\Delta t} \quad [\text{pmol}_{\text{glc}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad \text{Equação 10}$$

$$q_{\text{lac}} = \frac{1}{\bar{X}_{\text{viáveis}}} \times \frac{\Delta \text{lac}}{\Delta t} \quad [\text{pmol}_{\text{lac}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad \text{Equação 11}$$

Onde: $\bar{X}_{\text{viáveis}}$: concentração média de células viáveis para o Δt considerado; Δglc : variação da concentração de glicose para o Δt considerado; Δlac : variação da concentração de lactato para o Δt considerado.

A produtividade celular (P_{celular}) dos cultivos foi obtida através da Equação 12, considerando o intervalo de tempo necessário para obter o número máximo de células.

$$P_{\text{celular}} = \frac{X_{\text{máximo}} - X_{\text{inicial}}}{t_{\text{xmáximo}} - t_{\text{xinicial}}} \quad [\times 10^7 \text{ cel.L}^{-1}.\text{d}^{-1}] \quad \text{Equação 12}$$

Onde: $X_{\text{máximo}}$: concentração máxima de células aderidas aos microcarregadores;
 X_{inicial} : concentração inicial de células aderidas aos microcarregadores.

4.23. Análise estatística

Os dados de concentração celular, $Y_{\text{lac/glc}}$, q_{glc} e q_{lac} foram apresentados como média e desvio padrão. Foi empregado o teste de Mann-Whitney para análise estatística dos dados de expansão celular entre os cultivos SW_{mod} e W_{mod} . O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para análise estatística do ângulo de contato e da rugosidade do filme interno da Cellbag. Foi considerada diferença estatística para valor de $p < 0,05$.

Para análise estatística da distribuição de diâmetros de partículas (microcarregadores isolados ou agregados de microcarregadores) entre os cultivos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, com mínimo de 80 amostras por grupo (cultivo). Foi considerada diferença estatística para valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A seção de Resultados será iniciada pela descrição dos problemas operacionais que ocorrem durante o cultivo da CTM-CU no Biorreator Wave™ com a Cellbag em posição normal de operação - Wave_{normal} (5.1.). Em seguida, será apresentado o coeficiente de transferência de oxigênio dissolvido para a Cellbag operada dentro do suporte (5.2.). A análise do filme interno da Cellbag, antes e após o cultivo da CTM-CU, será apresentada no item 5.3. Os cultivos controle em spinner serão descritos no item 5.4. Os cultivos no Biorreator Wave™ serão descritos nos itens 5.5. (Spinner-Wave_{mod}) e 5.6. (Wave_{mod}). As análises de diferenciação celular, imunofenotipagem e expressão gênica serão apresentadas no item 5.7. e, no item 5.8., a análise de vesículas extracelulares obtidas nos cultivos da CTM-CU.

5.1. Caracterização dos problemas operacionais identificados no Biorreator Wave™ durante o cultivo da CTM-CU

O depósito de microcarregadores no plástico da Cellbag foi o principal problema enfrentado na utilização do Biorreator Wave™ para cultivo de CTM. Com a perda dos microcarregadores aderidos ao plástico, o desempenho do cultivo é afetado negativamente. A deposição de partículas na Cellbag também é descrita em estudo sobre expansão de iPSC no Biorreator Wave™, no qual é relatado o depósito de agregados de células nas superfícies extremas da Cellbag (ESPINHA, 2014).

Esse problema acontece devido à movimentação dos microcarregadores durante a agitação, sendo impulsionados para as superfícies extremas da Cellbag pelo balanço unidirecional da plataforma, formando depósitos 'tipo duna' (JOSSEN et al., 2016). Tal problema tende a se agravar no decorrer do cultivo devido à presença de maior quantidade de matriz extracelular, aumentando a tendência de os microcarregadores ficarem retidos no plástico pela presença de componentes adesivos como a fibronectina, que atua na adesão e agregação das células (TSAI et al., 2017).

Quando ocorre a deposição de microcarregadores no plástico, não se verifica crescimento celular significativo, conforme mostrado na Figura 16. Nessa figura, foram fornecidos dados de pH apenas para evidenciar que não foi atingido nível de pH nocivo para a célula. A Figura 17 evidencia que, apesar da adesão inicial das células aos microcarregadores (Figura 17 A), com a perda de microcarregadores no plástico da Cellbag, a grande maioria dos microcarregadores encontra-se com pouca ou nenhuma célula ao término do cultivo (Figura 17 B).

Assim, a solução encontrada para reduzir o depósito de microcarregadores nas superfícies extremas, ocasionado pelo movimento unidirecional da plataforma, consistiu em colocar a Cellbag em um suporte para que adotasse um formato que não permitisse a deposição dos microcarregadores juntamente com as CTM aderidas, tal como foi descrito no item 4.5. (Material e Métodos). Nesse sistema, não ocorre a formação de depósitos “tipo duna”.

Além do depósito tipo duna, foram verificados na Cellbag depósitos de uma camada de microcarregadores nas superfícies laterais (região de borda líquido-gás). Esse problema tende a ser intensificado quanto maior a agitação empregada, sendo maior o impulso para o microcarregador ser direcionado ao plástico e ficar retido, não retornando ao líquido. Assim como ocorre com o depósito “tipo duna”, o depósito na superfície lateral da Cellbag também tende a agravar-se no decorrer do cultivo, devido à maior presença de matriz extracelular.

A representação do movimento da plataforma do biorreator com movimento ondulatório, entre as posições -1 e +1, é mostrada na Figura 18 A. Nas Figuras 18 B, C, D e E, são apresentadas as regiões de depósito de microcarregadores na Cellbag, os quais ocorrem ao longo do cultivo, sendo mais intensos quanto mais matriz extracelular é produzida pelas células. Os depósitos tipo duna são formados na superfície inferior das extremidades da Cellbag, indicados pelos retângulos em preto. Já os depósitos nas paredes da Cellbag ocorrem ao longo da superfície lateral (na região de borda do líquido), abrangendo a área apresentada pelos retângulos em tracejado azul.

Figura 16. Comportamento do cultivo da CTM-CU com microcarregador CultiSpher-S[®] no Biorreator Wave[™] sem modificação do formato da Cellbag. Cultivo com meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de CultiSpher-S[®] de 4,2 e 0,8 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 100 mL na adesão e de 500 mL no início da fase de expansão.

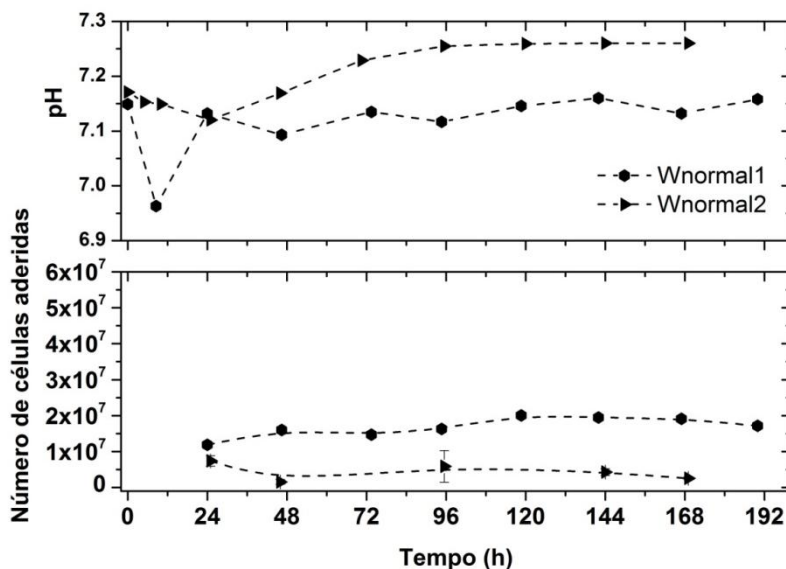


Figura 17. Imagens dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica após aplicação do método MTT, evidenciando a presença das CTM-CU aderidas aos microcarregadores (regiões escuras sobre os microcarregadores), em cultivo com a Cellbag em posição normal de operação com (A) 24 h e (B) 168 h. Magnificação: 100x.

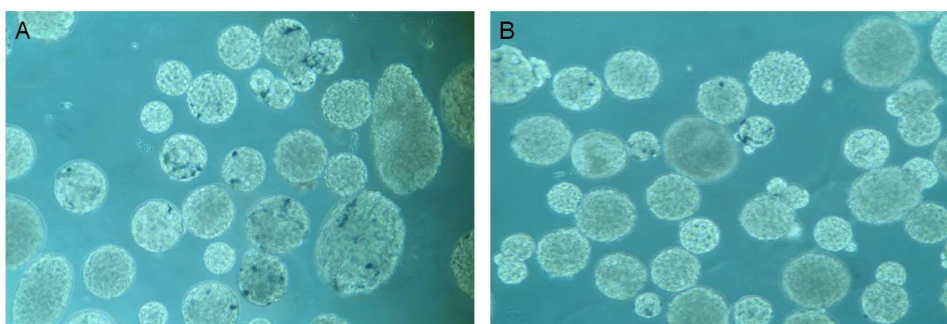
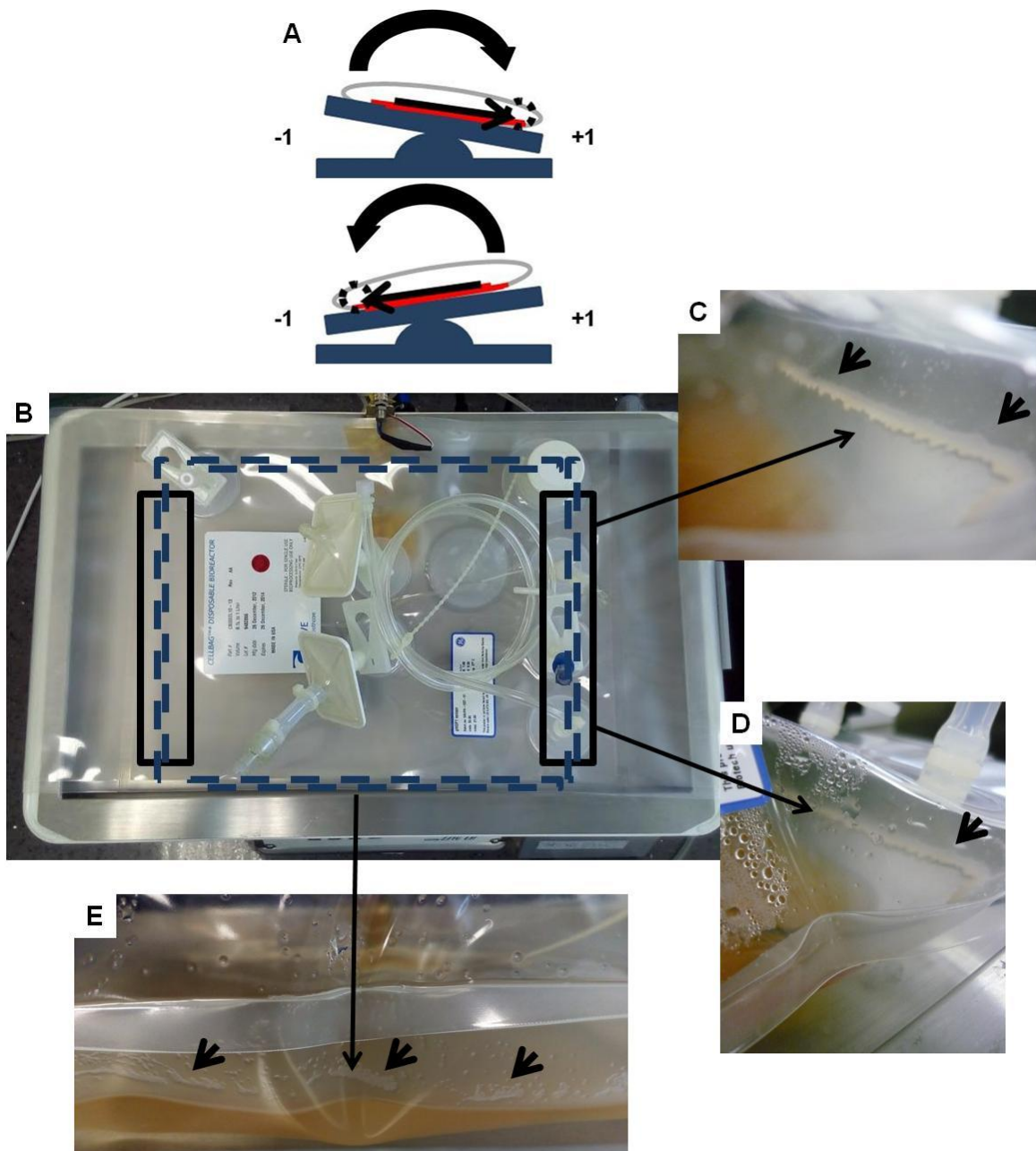


Figura 18. (A) Representação do movimento da plataforma do biorreator com movimento ondulatório, com a Cellbag em posição normal de operação. Movimento no sentido horário (posição -1 para +1), levando à deposição de partículas na posição +1. Movimento no sentido anti-horário (posição +1 para -1), levando à deposição de partículas na posição -1. (B) Locais propensos à adesão dos microcarregadores, ao longo do cultivo da CTM-CU, indicados pelos retângulos em preto (depósito tipo duna) e em tracejado azul (depósito na superfície lateral - região de borda do líquido). (C e D) Depósito tipo duna de microcarregadores nas superfícies inferiores extremas da Cellbag, observado em cultivo com volume de 450 mL e agitação de 12 rpm/6°. (E) Depósito na superfície lateral observado em cultivo com volume de 470 mL e agitação de 14 rpm/8°.

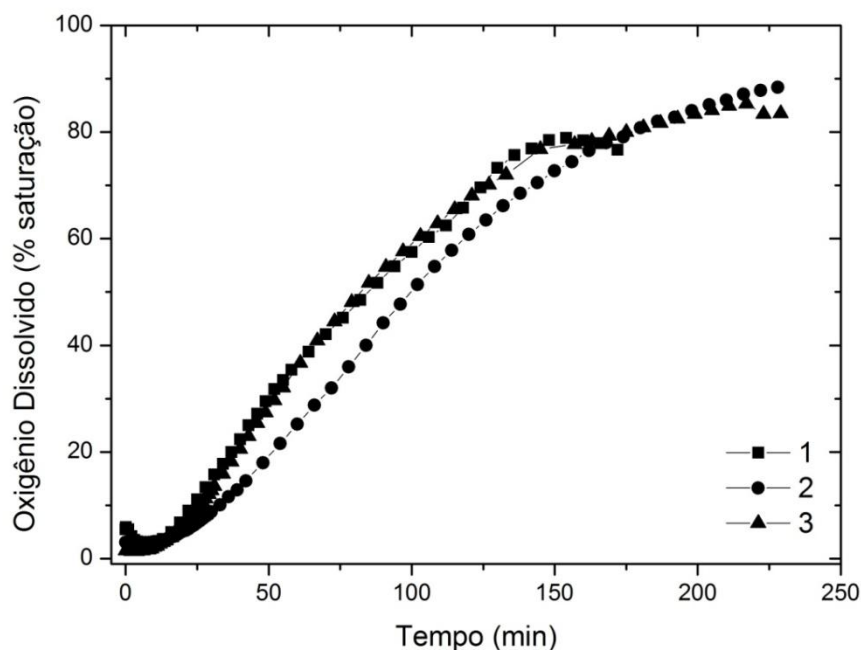


5.2. Coeficiente de transferência de oxigênio dissolvido – Potência Dissipada

O coeficiente de transferência de oxigênio dissolvido obtido para a Cellbag no novo formato de operação e com as condições empregadas nos cultivos no Biorreator Wave™, foi de $0,66 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ (Figura 19). São reportados valores de $0,5 - 24,1 \text{ h}^{-1}$ para biorreator com movimento de ondas (EIBL; EIBL, 2009). Para o modelo BioWave de 1L com 30 rpm/6° e 0,25 vvm, o k_{La} é de 4 h^{-1} (EIBL; WERNER; EIBL, 2009). Em Biorreator Wave™ de 2 L operando com 1 L, 20 rpm e 0,05 vvm, o k_{La} obtido é próximo à 3 h^{-1} (SINGH, 1999). O modelo de biorreator de ondas BIostat® CultiBag RM 2 L com agitação de 8 rpm/6° e 0,1 vvm, fornece k_{La} de $0,5 \text{ h}^{-1}$ (AL-RUBEAI, 2015). Para frasco spinner, os valores de k_{La} são da ordem de $0,1 - 4 \text{ h}^{-1}$ (PÖRTNER, 2015).

As CTMs apresentam baixa demanda de oxigênio, com consumo entre $0,012 - 8,1 \times 10^{-12} \text{ molO}_2 \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (RAFIQ et al., 2013; ZHAO et al., 2005). Em biorreator de tanque agitado, essa demanda pode ser alcançada por aeração superficial, operando na velocidade mínima para suspensão de partículas, sem provocar inibição do crescimento (NIENOW et al., 2016). Medições de oxigênio dissolvido ao longo dos cultivos SW_{mod} forneceram leituras em torno de 85% de saturação com ar.

Figura 19. Curvas de concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo da Cellbag, operando com o novo formato, para determinação do k_{La} pelo método dinâmico. Condições de operação: 0,067 vvm, 24rpm/4° e aeração com ar.



Com relação ao regime de agitação e potência específica, devido à operação da Cellbag com o formato modificado, a aplicação das relações apresentadas nas Figuras 6 e 8 não é válida. Contudo, pode-se inferir que a potência específica, para 600 mL de volume de trabalho (60% do volume de operação) e 33 rpm/2° (velocidade máxima aplicada durante os cultivos realizados neste trabalho), não excede o valor máximo aceitável para cultivo de células animais, já que com o novo formato da Cellbag, o movimento de onda não é completamente desenvolvido e, assim, não ocorrem as zonas de maior dissipação de energia nas regiões extremas da Cellbag (EIBL; EIBL, 2009).

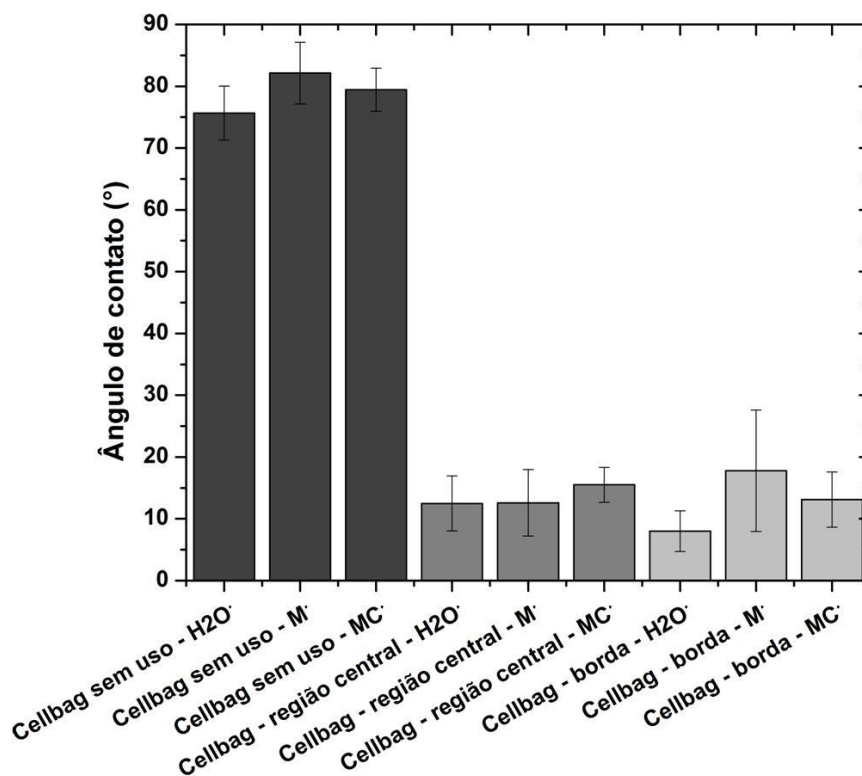
5.3. Análise da superfície interna da Cellbag: Ângulo de contato e Microscopia de Força Atômica

De acordo com especificação técnica da empresa General Electric HealthCare, a superfície interna da Cellbag é constituída de EVA/LDPE, formando um filme hidrofóbico (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES, 2014). As análises da interação entre gotícula dos três líquidos testados e uma Cellbag não utilizada em cultivo comprovou o caráter hidrofóbico da superfície interna da Cellbag, a qual apresentou ângulo de contato de $75,65 \pm 4,37^\circ$ (água ultrapura - H₂O), $82,12 \pm 4,96^\circ$ (meio de cultivo- M) e $79,44 \pm 3,47^\circ$ (meio condicionado - MC). Já a Cellbag após cultivo da CTM-CU apresentou ângulos de contato de $12,50 \pm 4,43^\circ$ (água ultrapura), $12,60 \pm 5,40^\circ$ (meio de cultivo) e $15,50 \pm 2,82^\circ$ (meio condicionado) na região central e de $8,0 \pm 3,30^\circ$ (água ultrapura), $17,79 \pm 9,83^\circ$ (meio de cultivo) e $13,13 \pm 4,47^\circ$ (meio condicionado) na superfície lateral da Cellbag (região de borda líquido-gás) (Figura 20).

Estes resultados indicam que, independente da tensão superficial do líquido utilizado para a análise, durante o cultivo o filme interno torna-se mais hidrofílico (redução do ângulo de contato), inclusive na região de borda, facilitando a deposição de microcarregadores no plástico devido ao aumento da molhabilidade, conforme observado pelo espalhamento das gotículas apresentado na Figura 21. A análise da superfície interna da Cellbag, através da técnica de microscopia de força atômica, mostrou que a Cellbag antes do uso apresentou rugosidade de $371,5 \pm 14,8$ nm, enquanto que a Cellbag após o cultivo da CTM-CU apresentou rugosidade de $145,4 \pm 11,1$ nm.

A presença de depressões na superfície da Cellbag antes do uso (Figuras 22 A, B, C e D) pode ter possibilitado a deposição de compostos presentes no meio de cultivo, gerando regiões mais planas (com menor rugosidade) no decorrer do cultivo da CTM-CU (Figuras 22 E, F, G e H).

Figura 20. Teste de molhabilidade para Cellbag antes do uso e Cellbag após cultivo da CTM-CU, com amostras retiradas da região central e região de borda do líquido (região lateral). Foi observada diferença estatística entre a Cellbag antes do uso e a Cellbag após cultivo da CTM-CU ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre a região central e a região de borda do líquido ($p > 0,05$). Legenda: H₂O: Água ultrapura; M: Meio de cultivo com 10% v/v SFB e MC: Meio Condicionado obtido no cultivo da CTM-CU.



A redução do ângulo de contato do filme interno (aumento da molhabilidade) pode estar relacionada com a adsorção, nas reentrâncias da Cellbag, de proteínas e de outros compostos provenientes do meio de cultivo e também liberados pelas CTM-CU durante o cultivo (CHAPMAN et al., 2001; LÜ et al., 2018; XU; SIEDLECKI, 2007). No caso de adsorção de proteínas, por exemplo, regiões contendo aminoácidos hidrofóbicos (como alanina e prolina) podem ter interagido com a superfície do filme da Cellbag e regiões contendo aminoácidos polares (como asparagina e glutamina) ficaram orientadas para o exterior, reduzindo o caráter hidrofóbico do filme interno. A mesma lógica pode ser empregada no caso da adsorção de lipídeos, com a região hidrofílica da molécula orientada para o exterior.

Para averiguar a hipótese apresentada acima (se ocorreu deposição de compostos, como proteínas no filme interno da Cellbag), amostras da Cellbag utilizada em cultivo da CTM-CU foram mantidas imersas em tripsina-EDTA 0,25% durante 30

minutos. A tripsina é uma protease que atua na quebra de cadeias contendo arginina ou lisina (OLSEN; ONG; MANN, 2004).

A análise de MFA de amostras da Cellbag utilizada em cultivo da CTM-CU, após tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, apresentaram aumento da rugosidade para $391.5 \pm 68,1$ nm (Figura 23). Valor semelhante ao obtido na análise da superfície interna de uma Cellbag não utilizada em cultivo. A análise da interação entre gotícula de água ultrapura e a superfície interna da Cellbag, após o tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, mostrou redução do nível de hidrofiliicidade da superfície interna, a qual apresentou aumento do ângulo de contato para $40,95 \pm 14,76^\circ$ (Figura 21 D e H).

Esses dados confirmam a hipótese de deposição de proteínas no filme interno da Cellbag. Apesar do aumento da rugosidade do filme interno após ação da tripsina, o filme recuperou apenas parcialmente o caráter hidrofóbico. Esses resultados sugerem que permaneceram regiões do filme contendo compostos não removidos pela tripsina, como proteínas não suscetíveis à ação da tripsina e lipídeos.

Figura 21. Imagens da interação entre gotícula de água ultrapura, logo após liberação, com a superfície interna da Cellbag para: (A) Cellbag antes do uso e (B) região central, (C) região de borda e (D) região central após tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, para Cellbag após cultivo da CTM-CU. Imagens após estabilização da gotícula para: (E) Cellbag antes do uso e (F) região central, (G) região de borda e (H) região central após tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, para Cellbag após cultivo da CTM-CU.

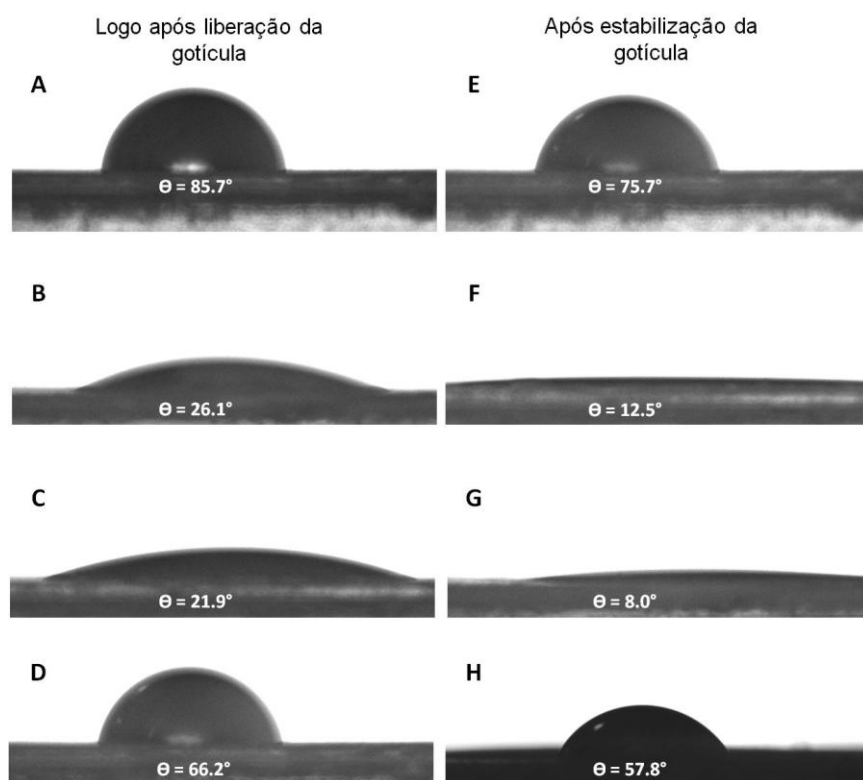


Figura 22. Imagens da superfície interna da Cellbag obtidas por microscopia de força atômica: vista topográfica em 2D (A e C) e vista em relevo (B e D) da Cellbag antes do uso; vista topográfica em 2D (E e G) e vista em relevo (F e H) da Cellbag após cultivo da CTM-CU.

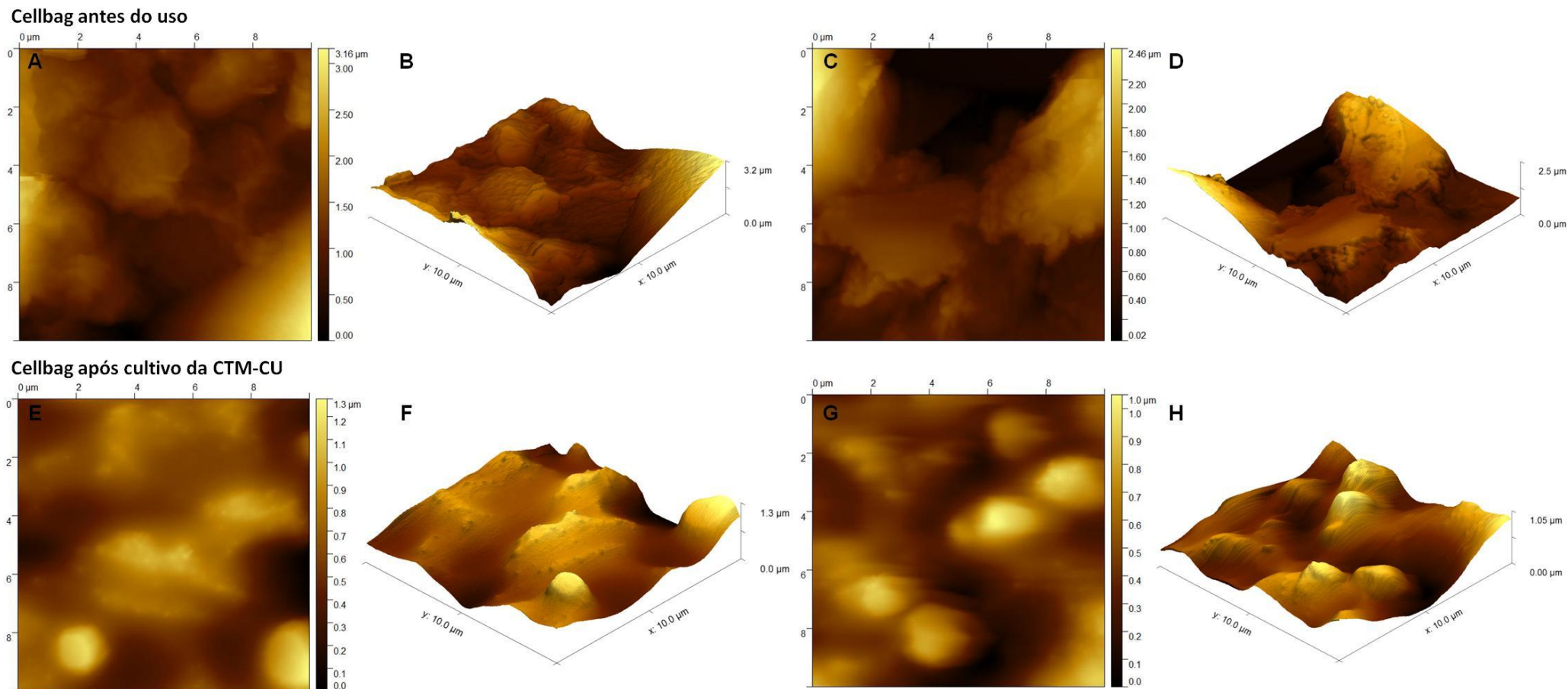
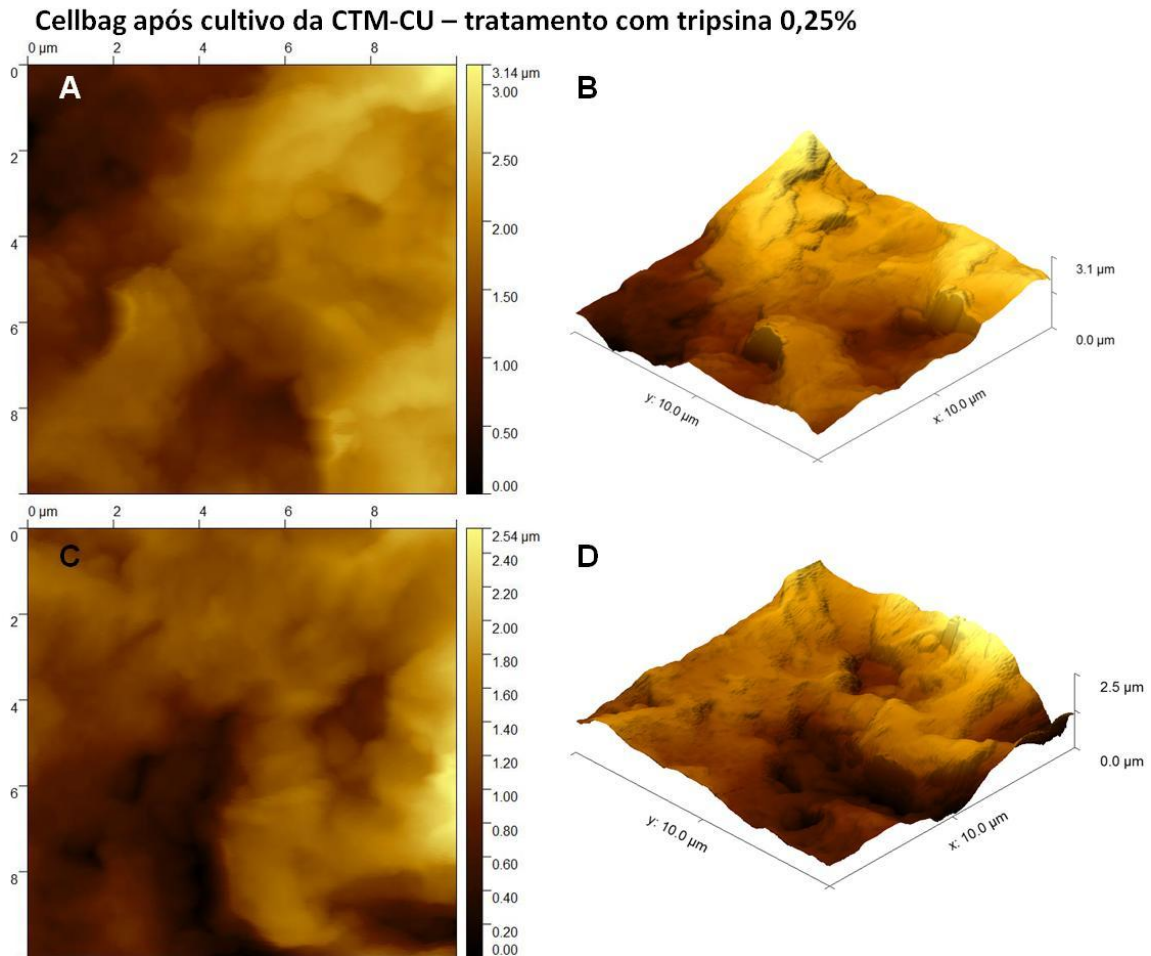


Figura 23. Imagens da superfície interna da Cellbag, após cultivo da CTM-CU e tratamento com tripsina-EDTA 0,25%, obtidas por microscopia de força atômica: vista topográfica em 2D (A e C) e vista em relevo (B e D). Foi observada diferença estatística entre a rugosidade da Cellbag após cultivo da CTM-CU e as rugosidades da Cellbag antes do uso ($p = 0,05$) e após tratamento com tripsina-EDTA ($p = 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre a rugosidade da Cellbag antes do uso e após tratamento com tripsina-EDTA ($p > 0,05$).



O aumento da molhabilidade do filme interno da Cellbag promove a interação entre partículas, como os microcarregadores ou agregados de células, e a Cellbag, o que facilita a deposição dos mesmos. Para aperfeiçoar o funcionamento dos biorreatores com movimento ondulatório no cultivo de células ancoradas em microcarregadores ou agregados celulares com produção de matriz extracelular, devem ser desenvolvidos novos materiais para o filme interno dos dispositivos descartáveis (Cellbags), visando à manutenção da hidrofobicidade (baixa molhabilidade) durante o cultivo.

5.4. Cultivos controle da CTM-CU em frasco Spinner - Cultivos S1_{CS}, S2_{CS}, S1_{MAG} e S2_{MAG}

Adesão e expansão em frasco Spinner

Para analisar o potencial de expansão da CTM-CU foram realizados cultivos em frasco spinner, empregando microcarregador Cultispher-S® e MAG, em condições semelhantes às empregadas nos cultivos realizados no Biorreator Wave™. A escolha pelo spinner se baseou no fato do cultivo das CTMs nesse biorreator envolver uma metodologia bem conhecida, em escala de bancada e laboratorial, por seus bons resultados em termos de fator de expansão e de viabilidade celular. Convém lembrar que o frasco spinner tradicional não permite o controle do processo de cultivo com o rigor que demandam os órgãos reguladores. Por essa razão, seu uso em escala clínica e industrial é muito limitado, sendo normalmente substituído pelo biorreator de tanque agitado.

Cultivos S1_{CS} e S2_{CS}

A evolução dos cultivos S1_{CS} e S2_{CS} está apresentada nas Figuras 24 e 25, respectivamente. Nos cultivos S1_{CS} e S2_{CS}, obteve-se, respectivamente, 73,5 e 83,3% de adesão das células inoculadas aos microcarregadores com 24 h. No S1_{CS}, durante o período de adesão, o pH manteve-se na faixa ideal, entre 6,8 - 7,4. Já no S2_{CS}, com 3,5 h, o pH apresentou elevação para 7,57, sendo reduzido para 7,39 com 6 h. Não houve esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações de lactato (S1_{CS}: 6,54 mM e S2_{CS}: 6,02 mM, com 168 h) e amônia (S1_{CS}: 1,57 mM com 168 h; S2_{CS}: 1,24 mM com 144 h) não atingiram níveis inibitórios para o crescimento da CTM-CU (SCHOP et al., 2009).

Durante a fase de crescimento exponencial, a relação de consumo de glicose e produção de lactato, $Y_{lac/glc}$, apresentou valor de $1,67 \pm 0,19$ (S1_{CS}) e $1,65 \pm 0,26$ (S2_{CS}) (mol_{lac}/mol_{glc}). O consumo específico médio de glicose foi de $0,24 \pm 0,18$ (S1_{CS}) e $0,25 \pm 0,19$ (S2_{CS}) ($pmol_{glc}.cel^{-1}.h^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,42 \pm 0,33$ (S1_{CS}) e $0,39 \pm 0,42$ (S2_{CS}) ($pmol_{lac}.cel^{-1}.h^{-1}$). Esses resultados sugerem que as CTM-CU utilizaram a rota de fosforilação oxidativa para consumo de glicose, devido à relação de consumo de glicose e produção de lactato ter sido inferior ao valor de $2,0 mol_{lac}/mol_{glc}$ (SCHOP et al., 2010).

Figura 24. Cultivo S1_{CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de CultiSpher-S[®] de 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 144 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.

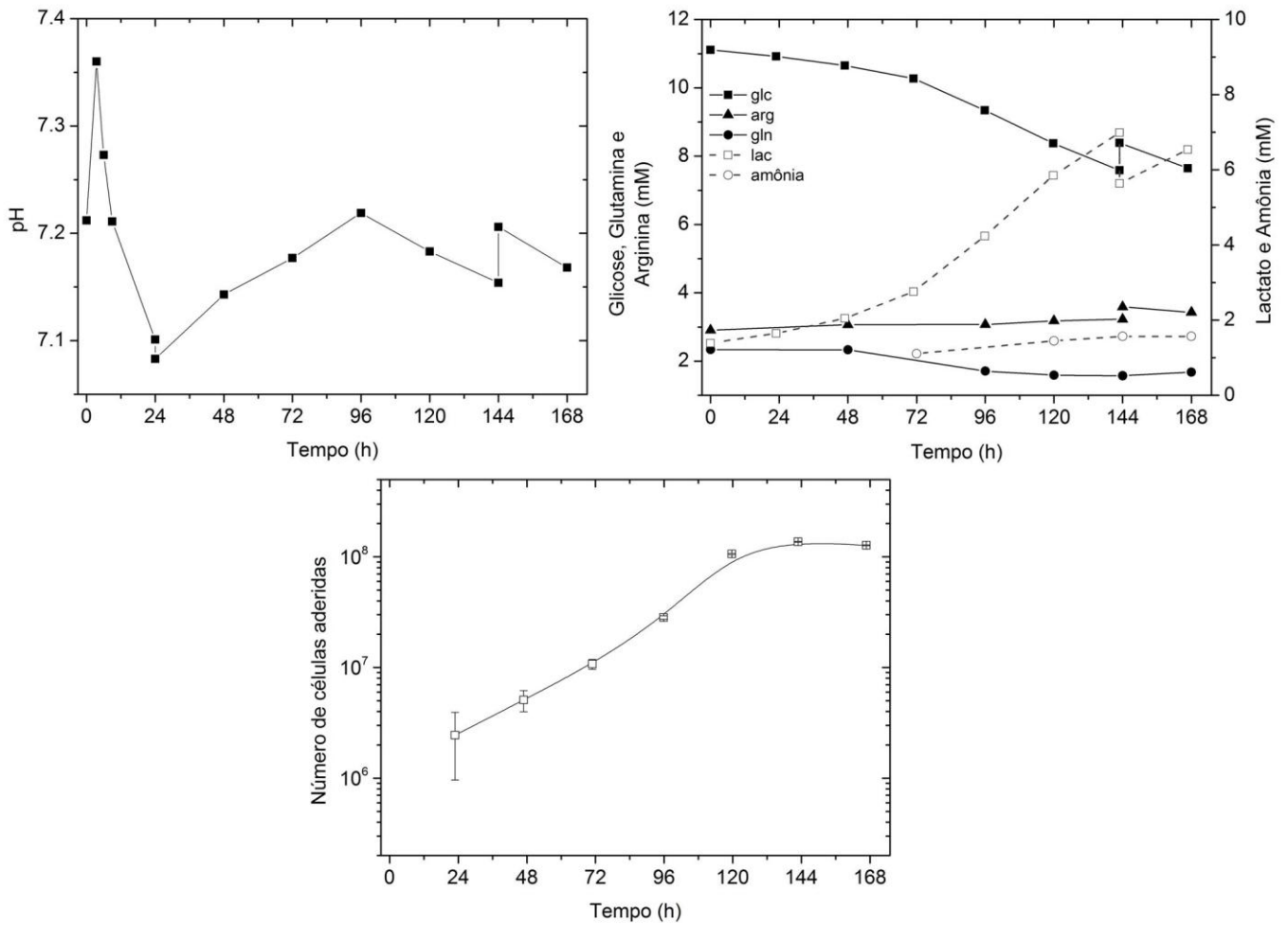
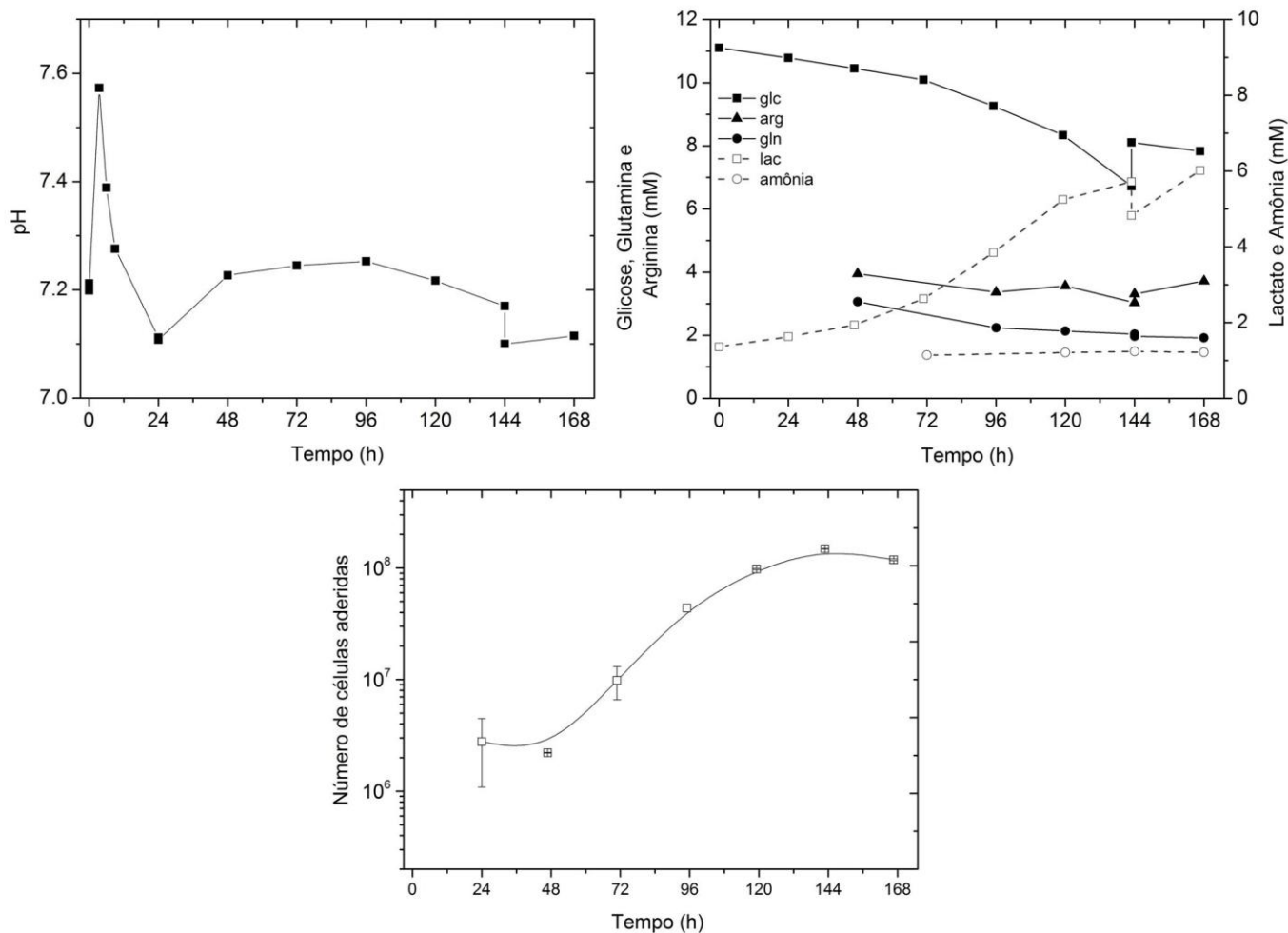


Figura 25. Cultivo S2_{CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de CultiSpher-S[®] de 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 144 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



Os cultivos S1_{CS} e S2_{CS} apresentaram fatores de expansão celular semelhantes. O fator de expansão obtido, com base nas células aderidas aos microcarregadores com 24 h, foi de 55,9 (S1_{CS}; com 144 h) e 53,5 (S2_{CS}; com 144 h). Considerando o total de células inoculadas, o fator de expansão foi de 41,1 (S1_{CS}) e 44,6 (S2_{CS}).

De acordo com a curva do número total de células aderidas aos microcarregadores, a velocidade específica máxima de crescimento foi de 0,041 h⁻¹ (R² = 0,983), entre 48 e 120 h, para o S1_{CS} e de 0,053 h⁻¹ (R² = 0,983), também entre 48 e

120 h, para o S2_{CS}. No S1_{CS}, a produtividade celular do cultivo foi de $13,4 \times 10^7$ cel.L⁻¹.d⁻¹ e no S2_{CS}, foi de $18,3 \times 10^7$ cel.L⁻¹.d⁻¹. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,22 \pm 0,02$ (S1_{CS}; com 120 h) e $1,21 \pm 0,01$ (S2_{CS}; com 144 h).

As Figuras 26 e 27 mostram a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e a variação do diâmetro médio de partículas ao longo dos cultivos S1_{CS} e S2_{CS}, respectivamente. No S1_{CS}, com 72 h, verificou-se a formação de agregados de microcarregadores, e o maior diâmetro observado foi de 0,654 mm, obtido em 168 h. Nesse cultivo, o diâmetro médio máximo observado foi de $0,337 \pm 0,129$ mm ao término do cultivo. No S2_{CS}, com 48 h, foi observada a formação de agregados de microcarregadores, e o maior diâmetro observado foi de 0,611 mm, obtido em 144 h. O diâmetro médio máximo observado no S2_{CS} foi de $0,292 \pm 0,094$ mm, também ao término do cultivo.

Figura 26. Cultivo S1_{CS}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.

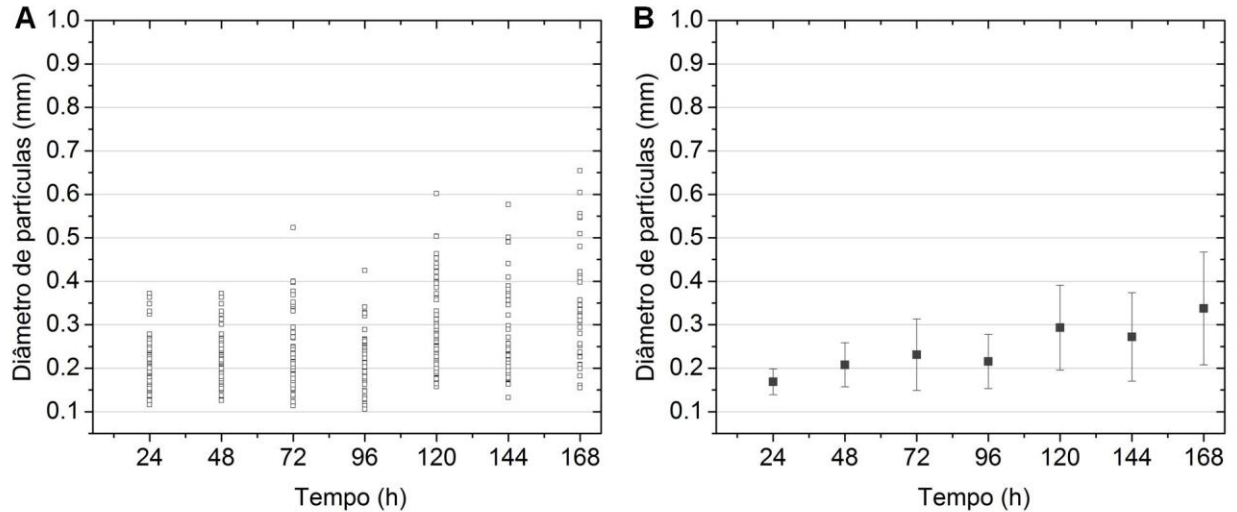
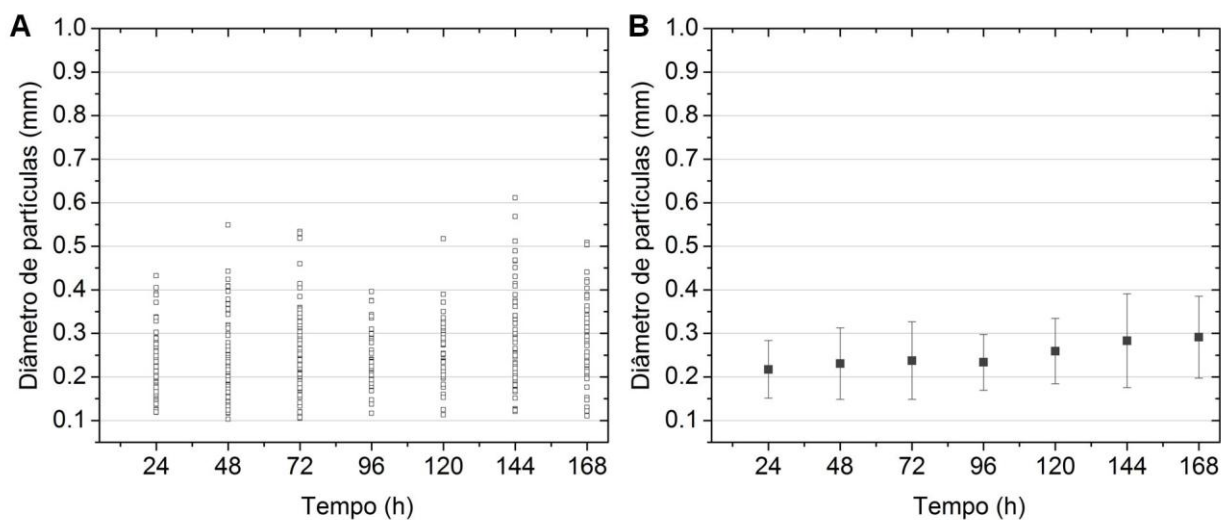


Figura 27. Cultivo S2_{CS}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



Cultivos S1_{MAG} e S2_{MAG}

Os cultivos S1_{MAG} e S2_{MAG} apresentaram adesão de 100% das células inoculadas aos microcarregadores, com 24 h. Os comportamentos dos cultivos S1_{MAG} e S2_{MAG} estão apresentados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

Em ambos os cultivos o pH manteve-se na faixa ideal, entre 6,8 - 7,4. Conforme analisado nas Figuras 28 e 29, não houve esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações de lactato (S1_{MAG} e S2_{MAG}: 6,81 mM, com 264 h) e amônia (S1_{MAG}: 1,85 mM com 264 h e S2_{MAG}: 1,85 mM com 216 h) não atingiram níveis inibitórios para o crescimento da CTM-CU (SCHOP et al., 2009).

Figura 28. Cultivo S1_{MAG}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de MAG de 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 7. Volume de trabalho de 150 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 168 e 216 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU.

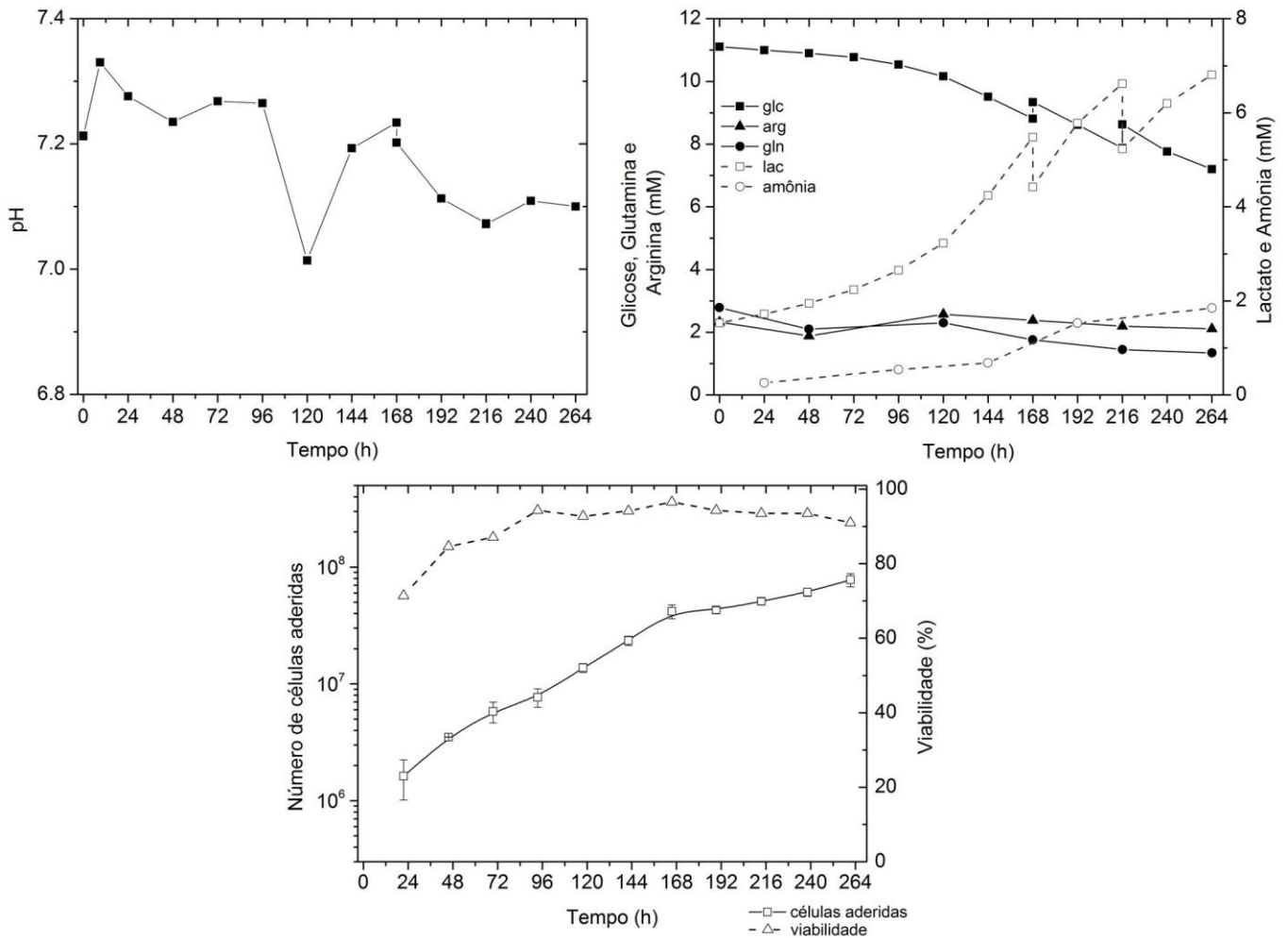
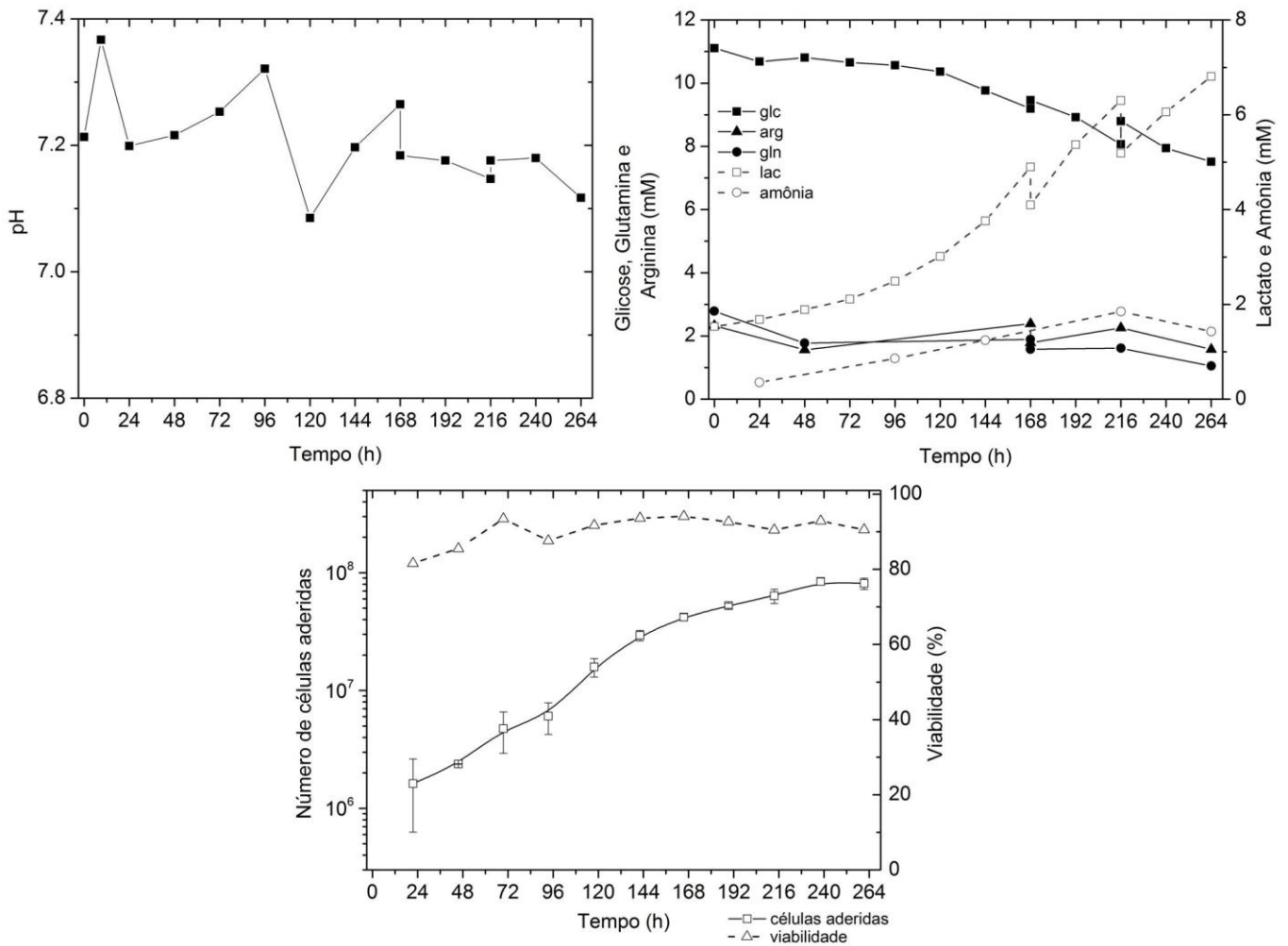


Figura 29. Cultivo S2_{MAG}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Concentração de MAG de 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, com relação célula/MC de 7. Volume de trabalho de 150 mL. Troca de 25% do meio de cultivo com 168 e 216 h. Dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU.



Durante a fase de crescimento, a relação de produção de lactato e consumo de glicose, $Y_{lac/glc}$, apresentou valor de $1,71 \pm 0,12$ ($S1_{MAG}$) e $1,98 \pm 0,67$ ($S2_{MAG}$) (mol_{lac}/mol_{glc}). O consumo específico médio de glicose foi de $0,20 \pm 0,04$ ($S1_{MAG}$) e $0,13 \pm 0,03$ ($S2_{MAG}$) ($pmol_{glc} \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,34 \pm 0,06$ ($S1_{MAG}$) e $0,30 \pm 0,12$ ($S2_{MAG}$) ($pmol_{lac} \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$). Esses resultados sugerem consumo de glicose primariamente através da rota de fosforilação oxidativa para o $S1_{MAG}$. Já para o $S2_{MAG}$, devido à maior relação $Y_{lac/glc}$, as CTM-CU poderiam estar alternando o consumo de glicose entre as rotas de fosforilação oxidativa e de glicólise anaeróbica (SCHOP et al., 2010).

Os cultivos $S1_{MAG}$ e $S2_{MAG}$ apresentaram viabilidade das CTM-CU recuperadas de 71,4 e 81,6% com 24 h, respectivamente. A viabilidade se manteve acima de 91%, a partir de 96 h, para o $S1_{MAG}$ e acima de 90%, a partir de 120 h, para o $S2_{MAG}$. O fator de expansão celular obtido foi de 47,9 ($S1_{MAG}$; com 264 h) e 51,8 ($S2_{MAG}$; com 240 h).

De acordo com a curva do número total de células aderidas aos microcarregadores, a velocidade específica de crescimento foi de $0,023 h^{-1}$ ($R^2 = 0,999$), entre 96 e 168 h, para o $S1_{MAG}$ e de $0,026 h^{-1}$ ($R^2 = 0,961$), também entre 96 e 168 h, para o $S2_{MAG}$. A produtividade celular dos cultivos foi de $5,1$ e $6,1 \times 10^7 cel.L^{-1}.d^{-1}$, para o $S1_{MAG}$ e $S2_{MAG}$, respectivamente. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,57 \pm 0,02$ ($S1_{MAG}$; com 168 h) e $1,52 \pm 0,02$ ($S2_{MAG}$; com 168 h), valores superiores aos registrados nos cultivos em spinner com o microcarregador CultiSpher-S[®].

As Figuras 30 e 31 mostram a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e a variação do diâmetro médio de partículas ao longo dos cultivos $S1_{MAG}$ e $S2_{MAG}$, respectivamente. Os microcarregadores MAG apresentaram maior dispersão de diâmetro de microcarregadores, quando comparado aos microcarregadores CultiSpher-S[®]. Também foram obtidos diâmetros médios de agregados superiores aos cultivos $S1_{CS}$ e $S2_{CS}$. No cultivo $S1_{MAG}$, o maior diâmetro de partícula observado foi de 1,438 mm, obtido em 264 h. O diâmetro médio máximo observado foi de $0,670 \pm 0,249$ mm, com 240 h de operação. No cultivo $S2_{MAG}$, o maior diâmetro de partícula foi de 1,614 mm, obtido em 240 h. O diâmetro médio máximo observado foi de $0,748 \pm 0,348$ mm, com 240h. Esses resultados indicam que pode ter ocorrido limitação do cultivo relativo à transferência de massa nas partículas com diâmetro acima de 0,300 mm (diâmetro de partícula limite para não haver restrições na transferência de massa) (KINNEY; SARGENT; MCDEVITT, 2011; SEN; KALLOS; BEHIE, 2001).

Figura 30. Cultivo S1_{MAG}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.

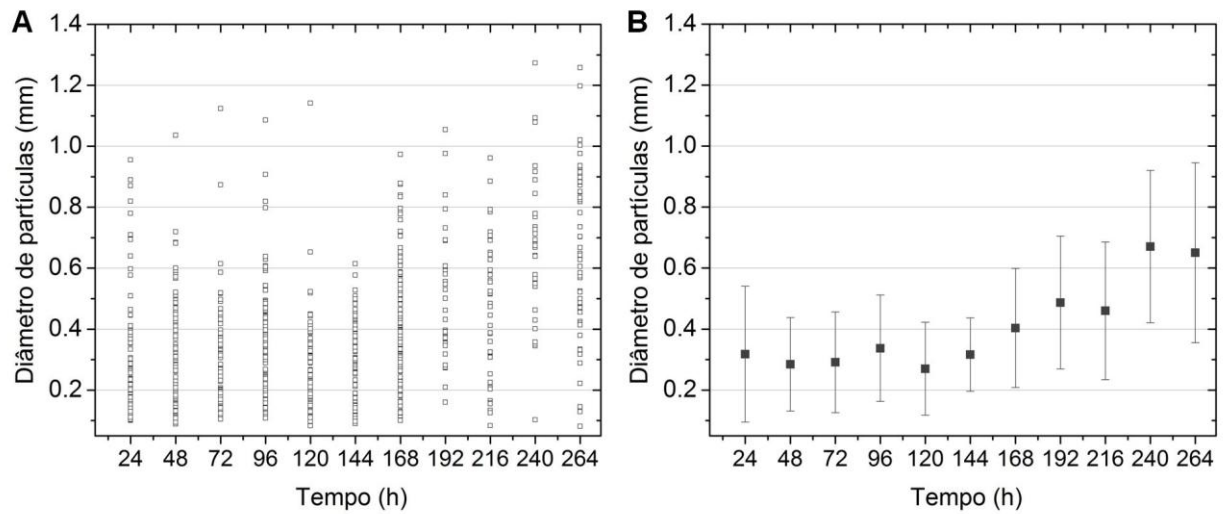
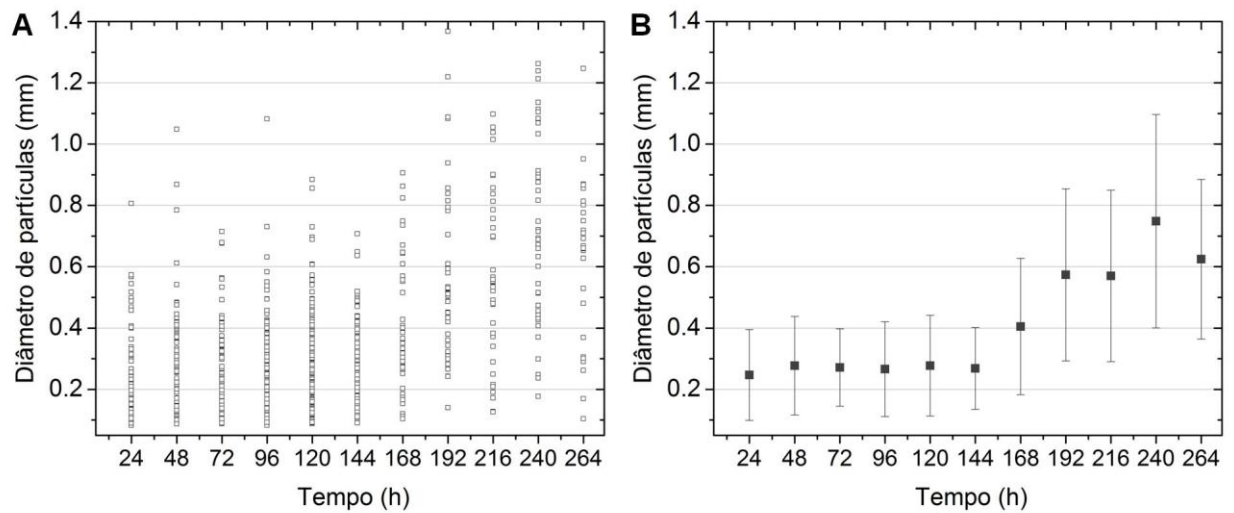


Figura 31. Cultivo S2_{MAG}: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (□) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (■) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



5.5. Cultivos da CTM-CU com fase de adesão em frasco Spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™ - Cultivos SW_{mod1CS}, SW_{mod2CS}, SW_{mod3CS} e SW_{mod4CS}

Análise da fase de adesão em frasco spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™

Para analisar a fase de expansão das CTM-CU no Biorreator Wave™ eliminando a variável relacionada à fase de adesão célula-microcarregador, foram realizados quatro cultivos com fase de adesão em frasco spinner de 0,5 L, operando com 0,2 L, com microcarregador CultiSpher-S® na concentração de 2,1 gMC/L, e posterior transferência para a Cellbag após 24 h de cultura, operando com 0,7 gMC/L. No cultivo SW_{mod4CS} foi avaliada a utilização do suplemento Pluronic F-68 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), a fim de promover proteção celular.

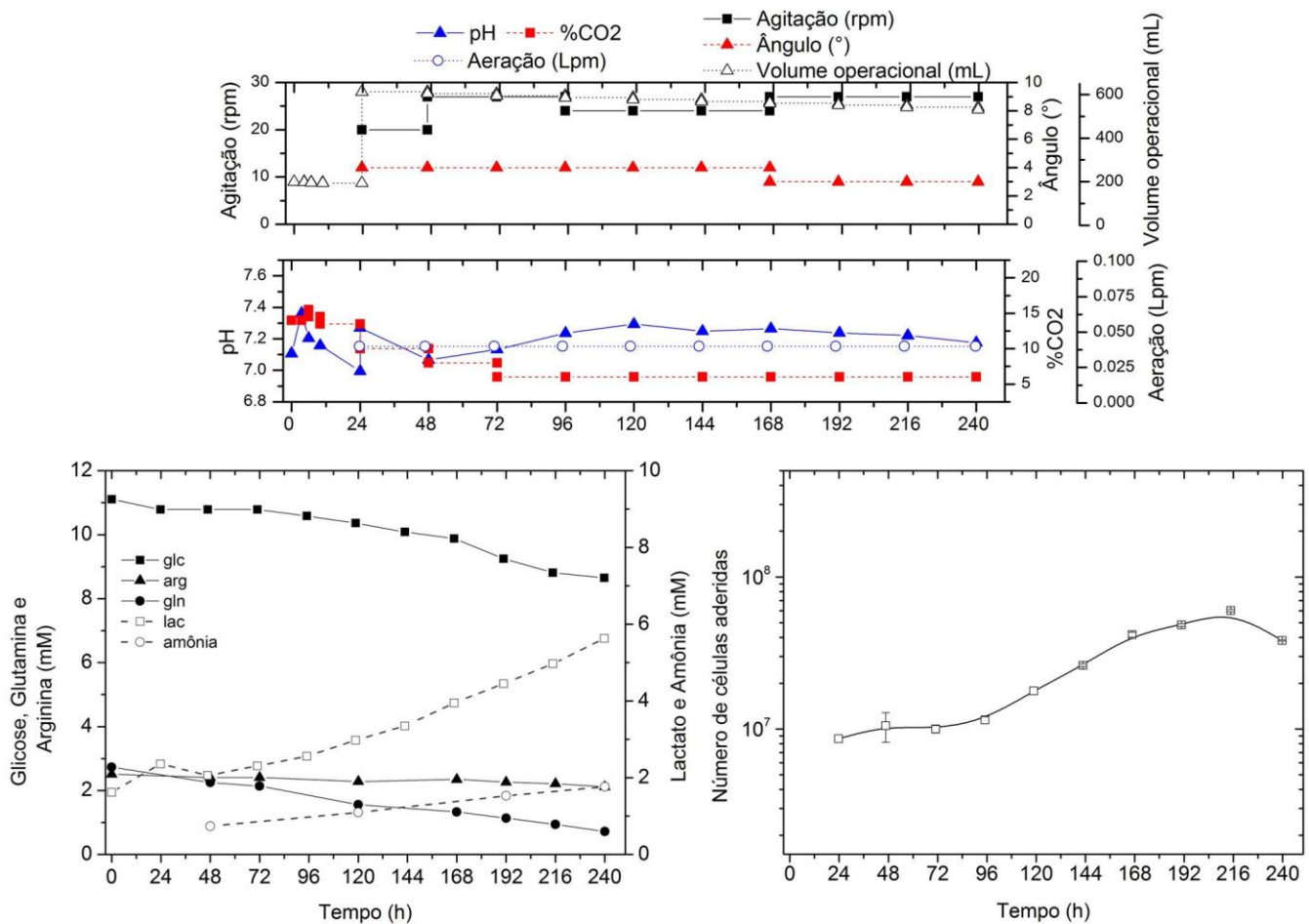
Cultivo SW_{mod1CS}

A Figura 32 apresenta o comportamento do cultivo da CTM-CU durante o SW_{mod1CS}. O SW_{mod1CS} apresentou 86,3% de adesão das células aos microcarregadores, segundo o dado de células aderidas obtido pelo método MTT.

Neste cultivo foi realizado estudo para averiguar a melhor condição de agitação da plataforma, com o formato da Cellbag modificado. Aplicando 30 rpm e 4° mantidos por 2 h, em cultivo com 48 h de operação, verificou-se aumento do número de microcarregadores sendo depositados no plástico sem retornar para o líquido. Com 27 rpm e 4° verificou-se pequena adesão de microcarregadores nas bordas da Cellbag, entre 48 e 72 h. Mantida essa agitação, ocorreu adesão considerável dos microcarregadores na região de borda líquido-gás entre 72 e 96 h, o que pode ter provocado estagnação do crescimento. Assim, definiu-se 24 rpm como agitação máxima de trabalho para 4° de inclinação da plataforma. A agitação foi mantida em 24rpm/4° entre 96 e 168 h, passando para 27rpm/3°, entre 168 e 240 h, para amenizar o depósito de microcarregadores na região de borda líquido-gás.

Conforme analisado na Figura 32, não houve esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações máximas de lactato e amônia foram de 5,63 mM e 1,76 mM com 240 h de operação, respectivamente, valores não inibitórios para o cultivo da CTM-CU (SCHOP et al., 2009). A relação $Y_{lac/glc}$ foi de $1,54 \pm 0,65$ (mol_{lac}/mol_{glc}) na fase de crescimento. O consumo específico médio de glicose foi de $0,34 \pm 0,14$ ($pmol_{glc} \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,42 \pm 0,18$ ($pmol_{lac} \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$).

Figura 32. Cultivo SW_{mod}1_{CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator WaveTM com 24 h. Concentração de CultiSpher-S[®] de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator WaveTM. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



O fator de expansão alcançado considerando as células aderidas foi de 7,0 vezes, com 216 h, e 6,0 vezes, considerando o total de células inoculadas. A velocidade específica de crescimento foi de $0,017 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,998$), entre 96 e 168 h. A produtividade do cultivo foi de $1,5 \times 10^7 \text{ cel.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,22 \pm 0,01$, com 240 h, valor semelhante ao obtido no cultivo em frasco spinner com microcarregador CultiSpher-S®.

Foi observado, com 192 h, depósito nível 3 de microcarregadores na região de borda líquido-gás, conforme apresentado na Figura 33. O diâmetro médio máximo de agregados foi de $0,253 \pm 0,093 \text{ mm}$ com 240 h (Figura 34). Os maiores diâmetros de partículas observados foram de 0,629 mm (72 h) e 0,616 mm (216 h). Jossen e colaboradores (2016) relataram agregados com diâmetro de 6 mm na expansão de CTM proveniente de tecido adiposo em biorreator com movimento ondulatório (JOSSEN et al., 2016). Em 240 h, o cultivo apresentou queda no crescimento, possivelmente relacionado à falta de espaço nos agregados de microcarregadores e ao baixo número de células em alguns microcarregadores, os quais podem ter sido originados nos eventos de deposição dos microcarregadores no plástico da Cellbag. Os microcarregadores aderidos ao plástico retornavam ao líquido durante os procedimentos diários de retirada de amostra.

Figura 33. Cultivo $\text{SW}_{\text{mod}1\text{CS}}$: Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 192 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag.

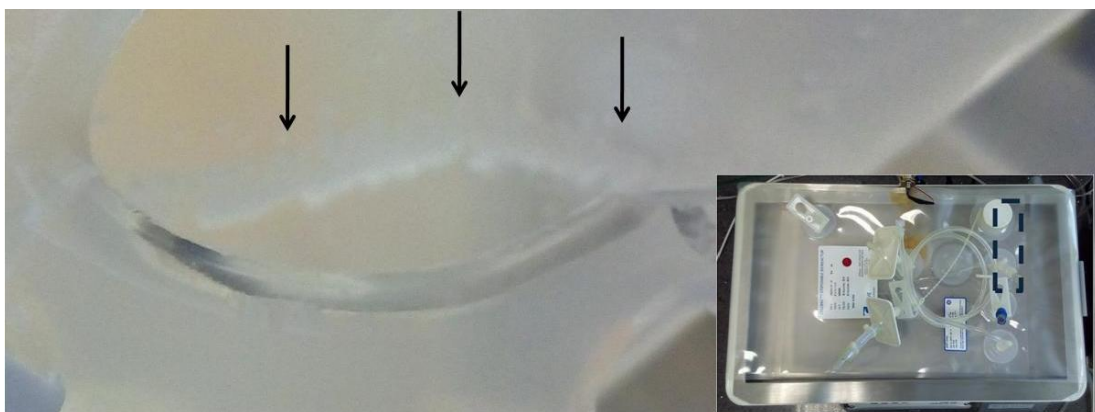
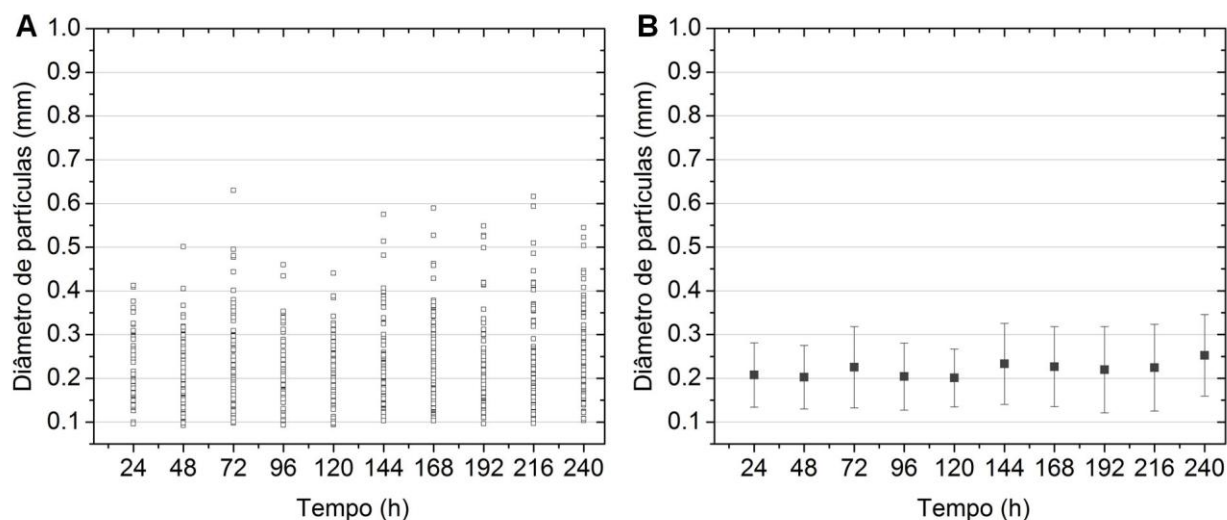


Figura 34. Cultivo SW_{mod1CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.

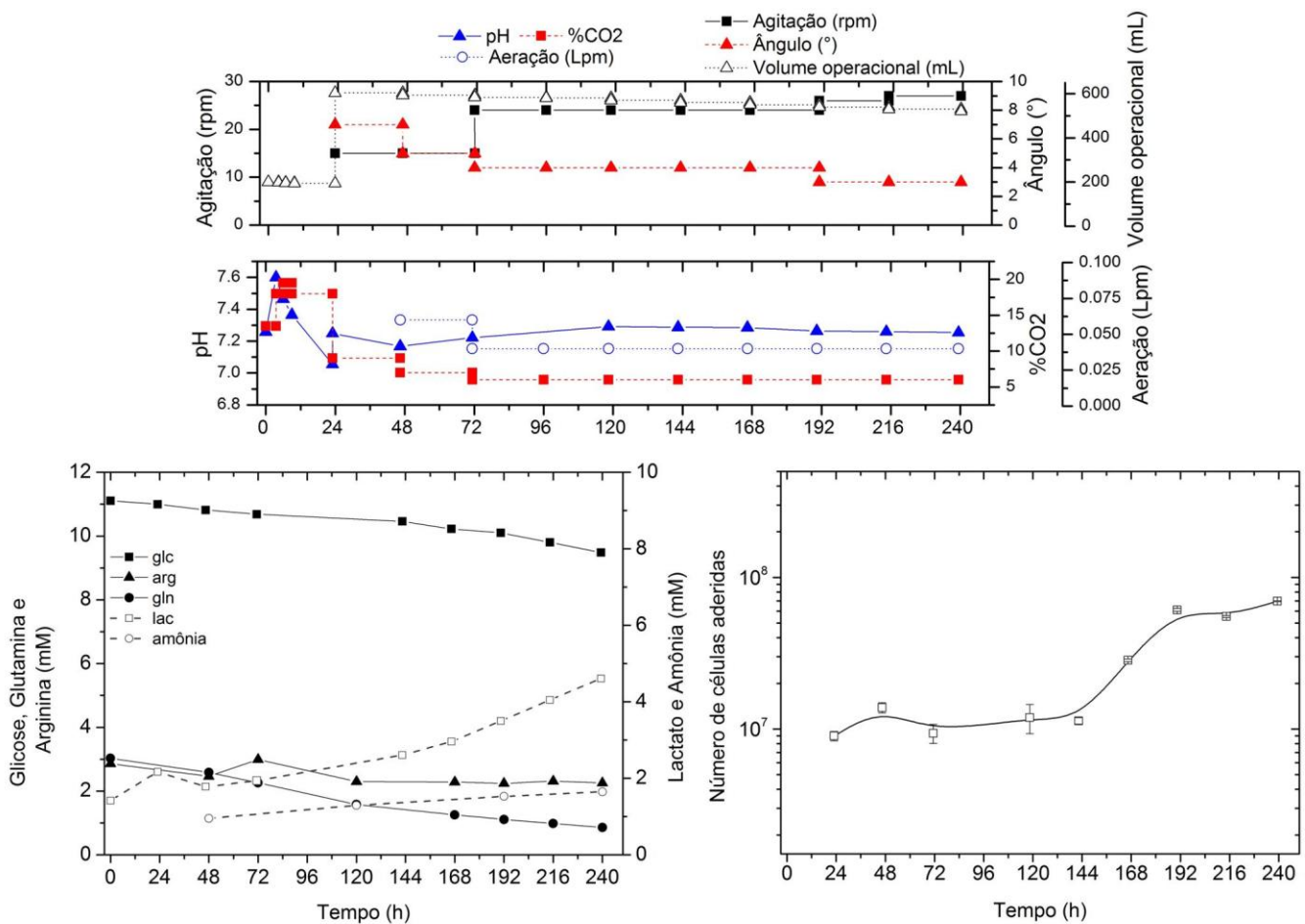


Cultivo SW_{mod2CS}

O cultivo SW_{mod2CS} apresentou 90% de adesão das células aos microcarregadores, segundo o dado de células aderidas obtido pelo método MTT (Figura 35). Durante o período de adesão o pH saiu da faixa ótima, atingindo 7,60 com 3,5 h. Entre 48 - 72 h e 216 - 240 h, foi observada pequena formação de depósito de microcarregadores aderidos ao plástico, na região de borda líquido-gás, considerado nível 1. Esse fato, juntamente com a elevação de pH e a necessidade de adaptação das células à hidrodinâmica do Biorreator WaveTM, podem ter acarretado no maior tempo para atingir a fase de crescimento, a qual iniciou com 144 h, verificado na Figura 35.

Não ocorreu esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações máximas de lactato e amônia foram de 4,61 mM e 1,64 mM com 240 h de operação, respectivamente, níveis não inibitórios para o cultivo da CTM-CU (SCHOP et al., 2009). A relação de consumo de glicose e produção de lactato, $Y_{lac/glc}$, apresentou valor de $1,72 \pm 0,84$ (mol_{lac}/mol_{glc}) para a fase de crescimento. O consumo específico médio de glicose foi de $0,20 \pm 0,13$ ($pmol_{glc}.cel^{-1}.h^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,29 \pm 0,09$ ($pmol_{lac}.cel^{-1}.h^{-1}$).

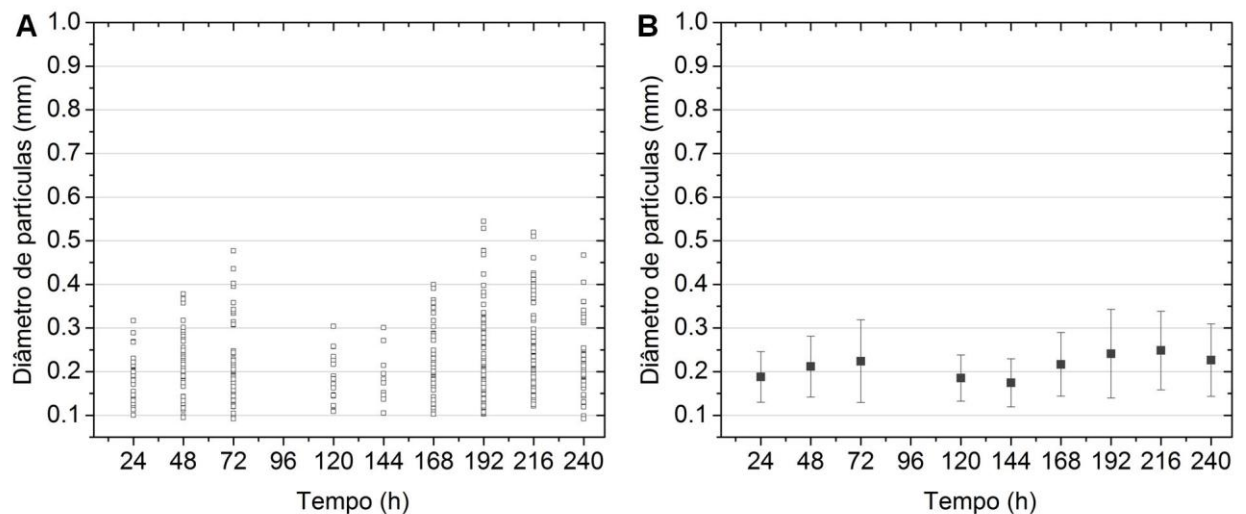
Figura 35. Cultivo SW_{mod}2_{CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator WaveTM com 24 h. Concentração de CultiSpher-S[®] de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator WaveTM. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



O fator de expansão celular atingiu 7,7 vezes considerando as células aderidas aos microcarregadores com 24 h e 7,0 vezes considerando o número de células inoculadas. A velocidade específica de crescimento foi de $0,035 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$), entre 144 e 192 h. A produtividade do cultivo foi de $1,7 \times 10^7 \text{ cel.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,45 \pm 0,01$, com 240 h.

A Figura 36 mostra a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e a variação do diâmetro médio de partículas ao longo do cultivo $\text{SW}_{\text{mod}2\text{CS}}$. O maior diâmetro de agregado observado foi de 0,544 mm, com 192 h, e o diâmetro médio máximo observado foi de $0,249 \pm 0,090 \text{ mm}$, com 216 h. Com 240 h, término do cultivo, ocorreu retenção de microcarregadores no plástico (nível 1) e verificou-se a presença de agrupamentos de microcarregadores no líquido. Contudo, esses agrupamentos não estavam ligados de forma coesa, já que não se verificou elevados valores médios de diâmetro de partículas.

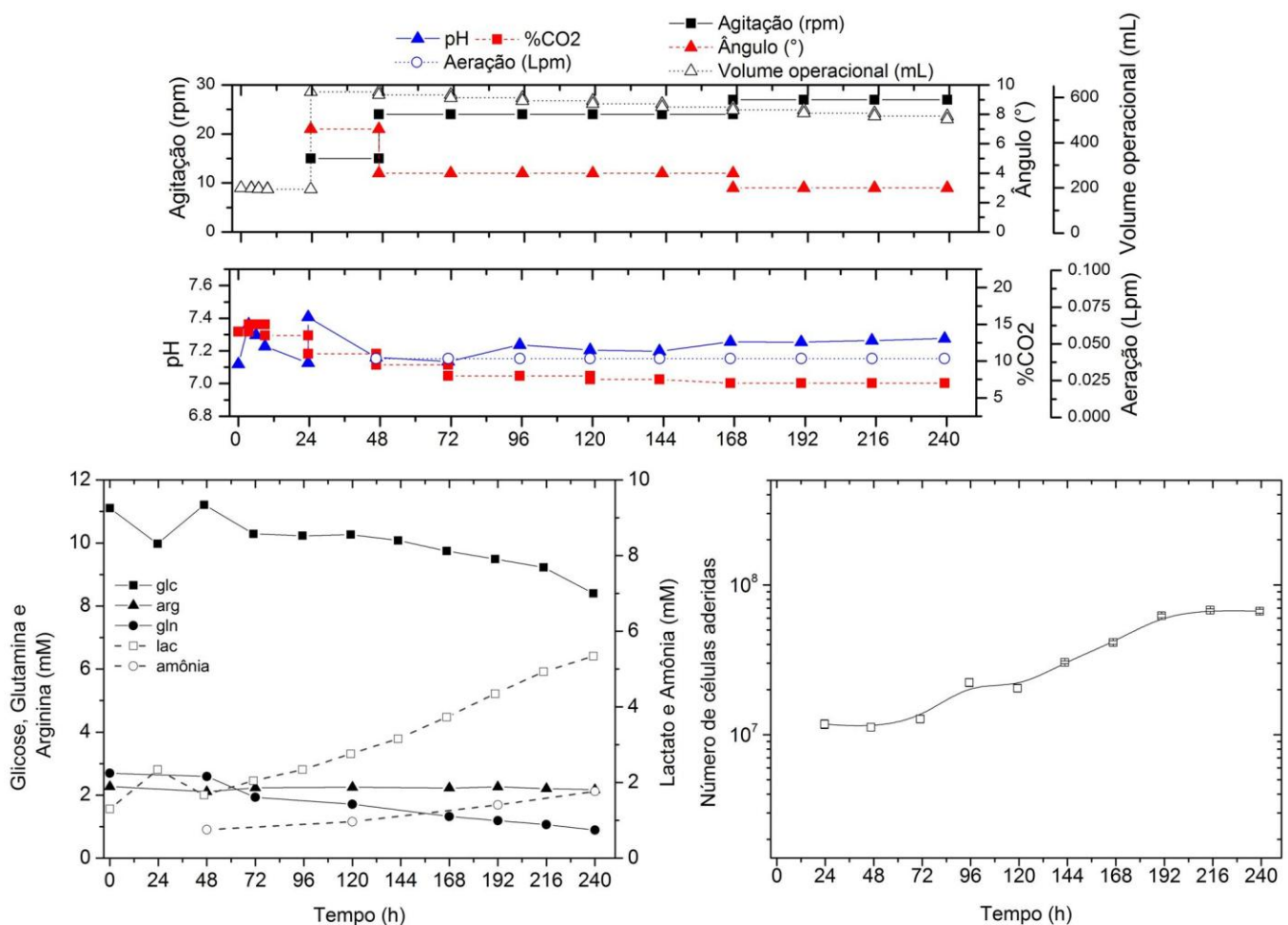
Figura 36. Cultivo $\text{SW}_{\text{mod}2\text{CS}}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



Cultivo SW_{mod3CS}

O cultivo SW_{mod3CS} apresentou 100% de adesão das células inoculadas aos microcarregadores, segundo o dado de células aderidas obtido pelo método MTT (Figura 37). O pH manteve-se na faixa ideal, entre 6,8 - 7,4 e não houve esgotamento dos principais nutrientes. As concentrações máximas de lactato e amônia foram de 5,34 mM e 1,76 mM, com 240 h de operação, respectivamente. Tais níveis não são inibitórios para o crescimento da CTM-CU (SCHOP et al., 2009).

Figura 37. Cultivo SW_{mod3CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator WaveTM com 24 h. Concentração de CultiSpher-S[®] de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator WaveTM. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



A relação entre o consumo de glicose e produção de lactato, $Y_{lac/glc}$, apresentou valor de $1,33 \pm 0,17$ (mol_{lac}/mol_{glc}) para a fase de crescimento. A relação de $Y_{lac/glc}$ menor que o valor de referência, $Y_{lac/glc}$ de 2,0 (mol_{lac}/mol_{glc}), indica metabolismo eficiente de consumo de glicose, utilizando a rota de fosforilação oxidativa (SCHOP, 2010). O consumo específico médio de glicose foi de $0,21 \pm 0,08$ ($pmol_{glc}.cel^{-1}.h^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,28 \pm 0,08$ ($pmol_{lac}.cel^{-1}.h^{-1}$).

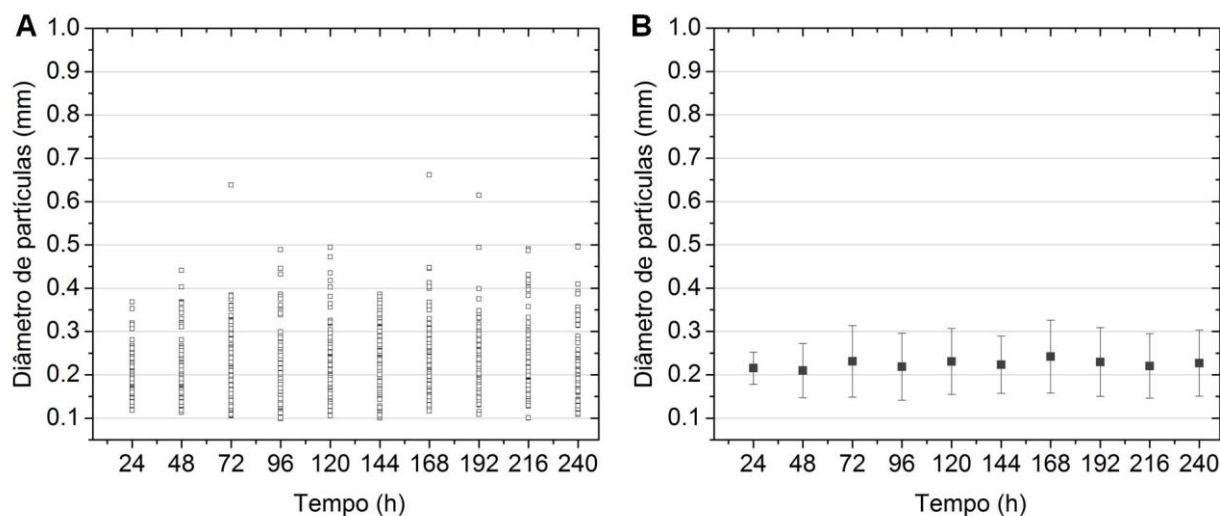
O fator de expansão celular atingiu 5,8 vezes com 216 h. A velocidade específica de crescimento foi de $0,015 h^{-1}$ ($R^2 = 0,996$), entre 120 e 192 h. A produtividade do cultivo foi de $1,4 \times 10^7 cel.L^{-1}.d^{-1}$. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,24 \pm 0,01$, com 216 h.

Assim como no cultivo SW_{mod2CS} , com 240 h verificou-se a presença de agrupamentos de microcarregadores no líquido (Figura 38). A Figura 39 apresenta a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e o diâmetro médio de partículas ao longo do cultivo SW_{mod3CS} . O diâmetro médio máximo observado foi de $0,242 \pm 0,084$ mm, com 168 h, obtendo-se leitura de partícula com diâmetro de 0,662 mm nesse ponto e de 0,638 mm com 72 h. Com 120 h, foi observado faixas de depósitos de microcarregadores (nível 2), não sendo mais verificado depósito no restante do cultivo. Apesar de apresentar agregados de microcarregadores com diâmetro na ordem de 0,600 mm, as médias dos diâmetros de partículas obtidas não foram problemáticas, já que permaneceram abaixo de 0,300 mm (diâmetro de partícula limite no qual não ocorre restrição na transferência de massa) (KINNEY; SARGENT; MCDEVITT, 2011; SEN; KALLOS; BEHIE, 2001).

Figura 38. Cultivo SW_{mod3CS} : Imagem do fundo da Cellbag com 240 h de operação (término do cultivo). Setas indicam agrupamentos de microcarregadores.



Figura 39. Cultivo SW_{mod3CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



Cultivo SW_{mod4CS}

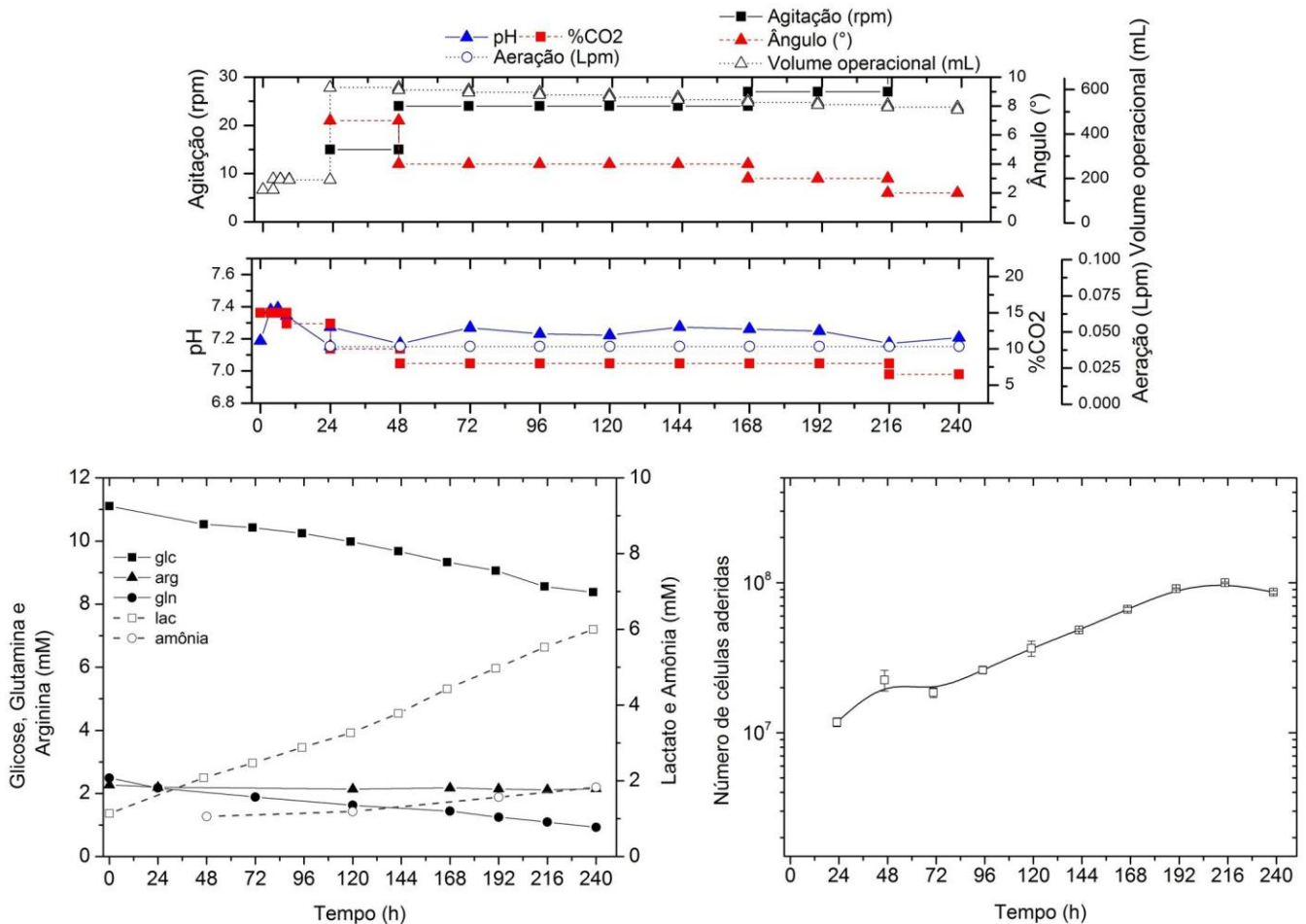
Assim como no SW_{mod3CS} , o cultivo SW_{mod4CS} apresentou 100% de adesão das células inoculadas aos microcarregadores, segundo o dado de células aderidas obtido pelo método MTT. Após 24 h de operação (período operado no frasco spinner), foi adicionado Pluronic-F68 (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) ao meio de cultivo, na concentração final de 0,1%. Tal como observado no gráfico do número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores (Figura 40), a adição de Pluronic-F68 não retardou o começo da fase de crescimento exponencial, comparando com os demais cultivos, a qual teve início com 72 h.

Conforme analisado na Figura 40, não houve esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações máximas de lactato e amônia foram de 6,0 mM e 1,83 mM com 240 h de operação, respectivamente. Esses valores não são inibitórios para o cultivo da CTM-CU (SCHOP et al., 2009). A relação, $Y_{lac/glc}$, foi de $1,43 \pm 0,32$ (mol_{lac}/mol_{glc}) na fase de crescimento, indicando metabolismo eficiente de consumo de glicose. O consumo específico médio de glicose foi de $0,21 \pm 0,06$ ($pmol_{glc} \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,30 \pm 0,11$ ($pmol_{lac} \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$).

No SW_{mod4CS} foi obtido o maior fator de expansão celular entre os cultivos Spinner-Wave_{mod}, o qual foi de 8,5 vezes com 216 h. A velocidade específica de crescimento foi de $0,013 h^{-1}$ ($R^2 = 0,999$), entre 72 h e 192 h. A produtividade celular do cultivo foi de $2,6 \times 10^7 cel \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$. Apesar da adição de Pluronic-F68, o LDH máximo

liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,35 \pm 0,02$ com 240 h, o segundo maior nível de LDH registrado entre os cultivos Spinner-Wave_{mod}.

Figura 40. Cultivo SW_{mod}4_{CS}: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fase de adesão em frasco spinner e transferência para o Biorreator WaveTM com 24 h. Concentração de CultiSpher-S[®] de 2,1 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 200 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da operação no Biorreator WaveTM. Após 24 h (período operado no frasco spinner), adição de Pluronic-F68 ao meio de cultivo na concentração final de 0,1%. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



Com 192 h foi observada pequena faixa de microcarregadores na região de borda líquido-gás (nível 1), sendo essa deposição maior a partir de 216 h, com depósito de microcarregadores nível 3, conforme verificado na Figura 41. A Figura 42 apresenta a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e o diâmetro médio de partículas ao longo do cultivo SW_{mod4CS} . O diâmetro médio máximo observado foi de $0,240 \pm 0,078$ mm com 192 h, apresentando diâmetro de partícula máximo de 0,592 mm nesse ponto.

Figura 41. Cultivo SW_{mod4CS} : Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 216 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag.

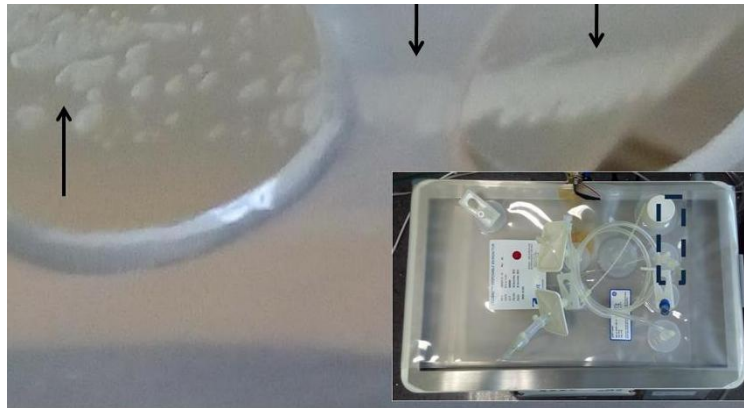
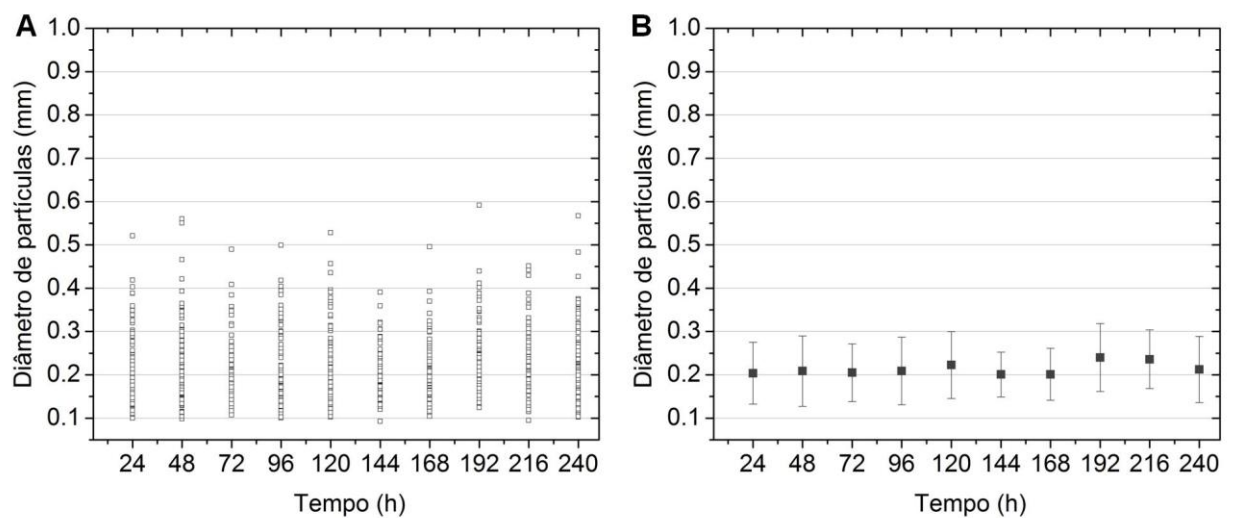


Figura 42. Cultivo SW_{mod4CS} : (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



5.6. Cultivos da CTM-CU com fase de adesão e fase de expansão realizadas no Biorreator Wave™ - Cultivos W_{mod1CS} , W_{mod2CS} , W_{mod3CS} , W_{mod4CS} , $W_{mod1MAG}$ e $W_{mod2MAG}$

Adesão e expansão no Biorreator Wave™

Para analisar o potencial do Biorreator Wave™ no cultivo da CTM-CU, operando a fase de adesão das células aos microcarregadores e a fase de crescimento na Cellbag com o novo formato, foram realizados cultivos com os microcarregadores CultiSpher-S® e MAG, descritos a seguir.

Cultivo W_{mod1CS}

A fase de adesão do cultivo W_{mod1CS} foi realizada com volume de trabalho de 75 mL, a fim de obter uma reduzida área de superfície molhada para evitar a perda de CTM-CU sedimentadas sobre o plástico da Cellbag.

Após 24 h, somente 43,5% das células estavam aderidas aos microcarregadores, de acordo com o dado obtido pelo método MTT. Conforme analisado na Figura 43, não houve esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações máximas de lactato e amônia foram de 3,40 mM e 1,69 mM com 240 h de operação, respectivamente. Tais níveis não são inibitórios para o cultivo da CTM-CU (SCHOP et al., 2009). A relação $Y_{lac/glc}$ foi de $1,43 \pm 0,51$ ($\text{mol}_{lac}/\text{mol}_{glc}$) na fase de crescimento, o que indica metabolismo eficiente de consumo de glicose (SCHOP, 2010). O consumo específico médio de glicose foi de $0,34 \pm 0,17$ ($\text{pmol}_{glc} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,49 \pm 0,30$ ($\text{pmol}_{lac} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

O fator de expansão alcançado considerando as células aderidas foi de 11,6 vezes, com 240 h, e de 5,1 vezes considerando o total de células inoculadas. A velocidade específica de crescimento foi de $0,037 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,932$), entre 168 e 216 h. A produtividade celular do cultivo foi de $1,3 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,28 \pm 0,01$, com 216 h.

A Figura 44 apresenta a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e o diâmetro médio de partículas ao longo do cultivo W_{mod1CS} . Obteve-se diâmetro de agregados com 0,675 mm em 168 h e 0,697 mm com 216 h. Apesar dessas leituras, o diâmetro médio máximo observado foi de $0,228 \pm 0,084$ mm, com 168 h. Foi observado depósito de microcarregadores nível 1 com 192 h, não sendo mais verificado depósitos no restante do cultivo.

Figura 43. Cultivo W_{mod1CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator WaveTM. Concentração de CultiSpher-S[®] de 5,5 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 75 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida com agitação de 2rpm/2° durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores

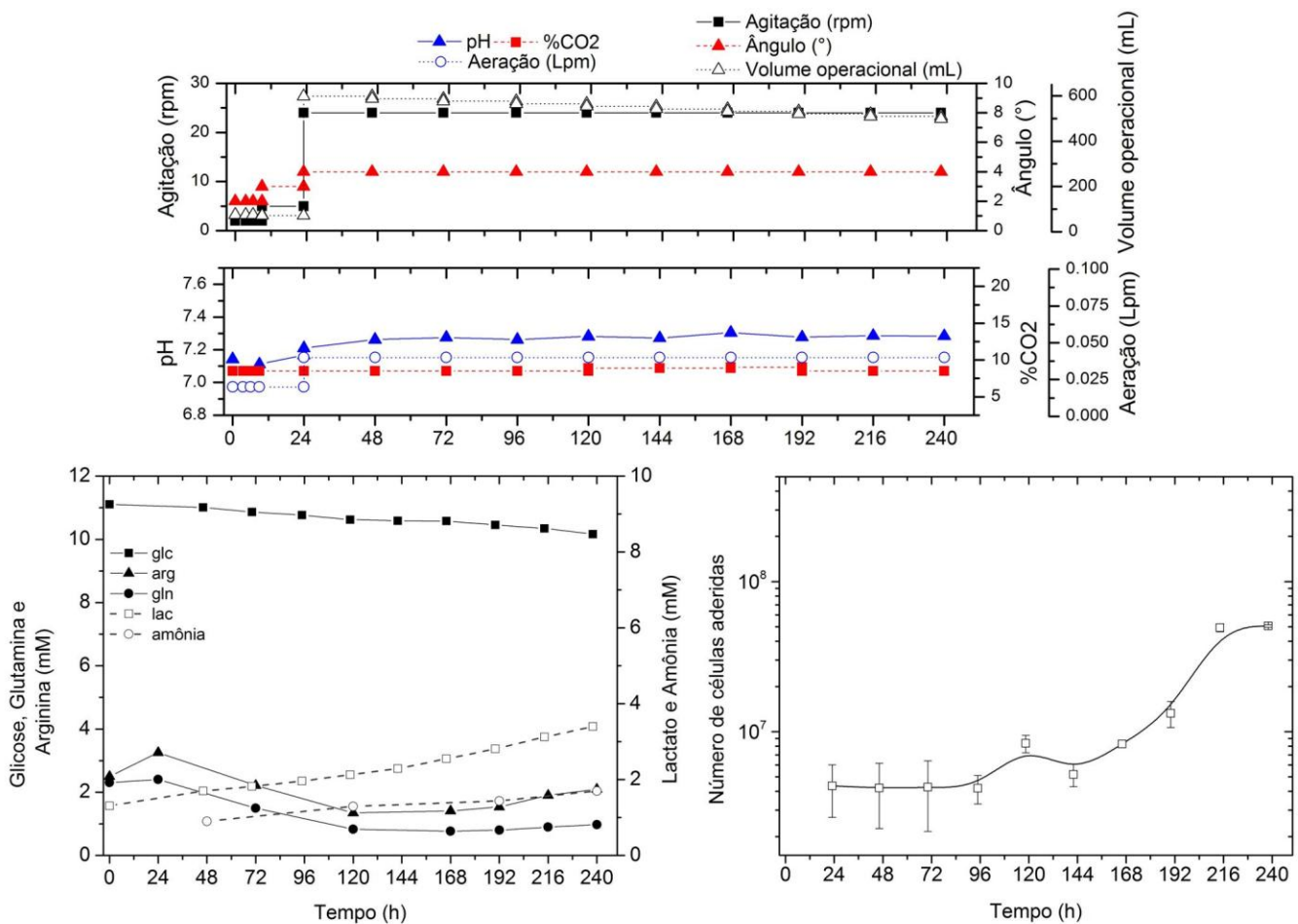
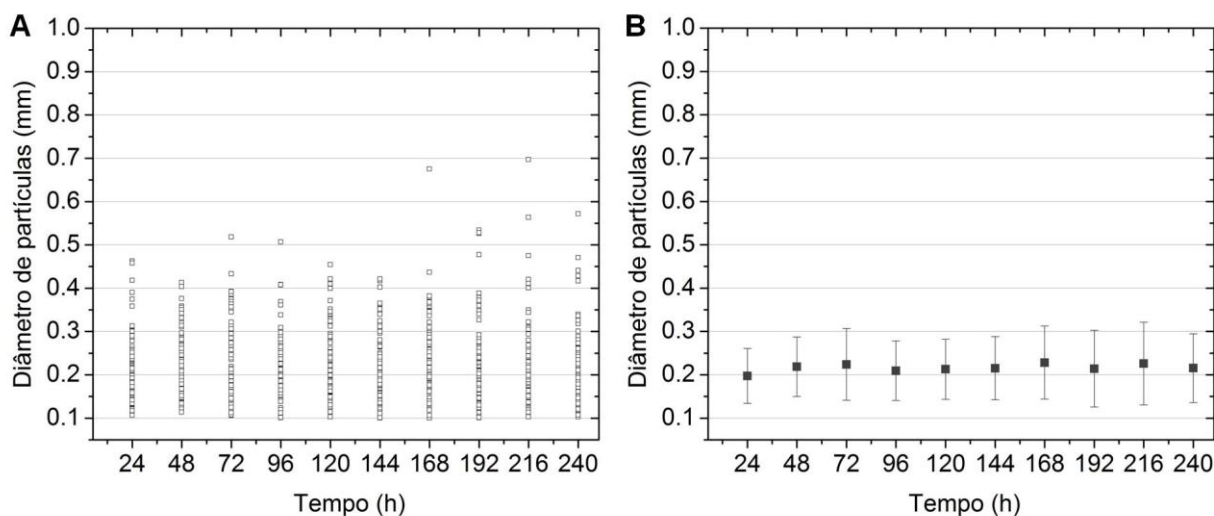


Figura 44. Cultivo $W_{\text{mod}1\text{CS}}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



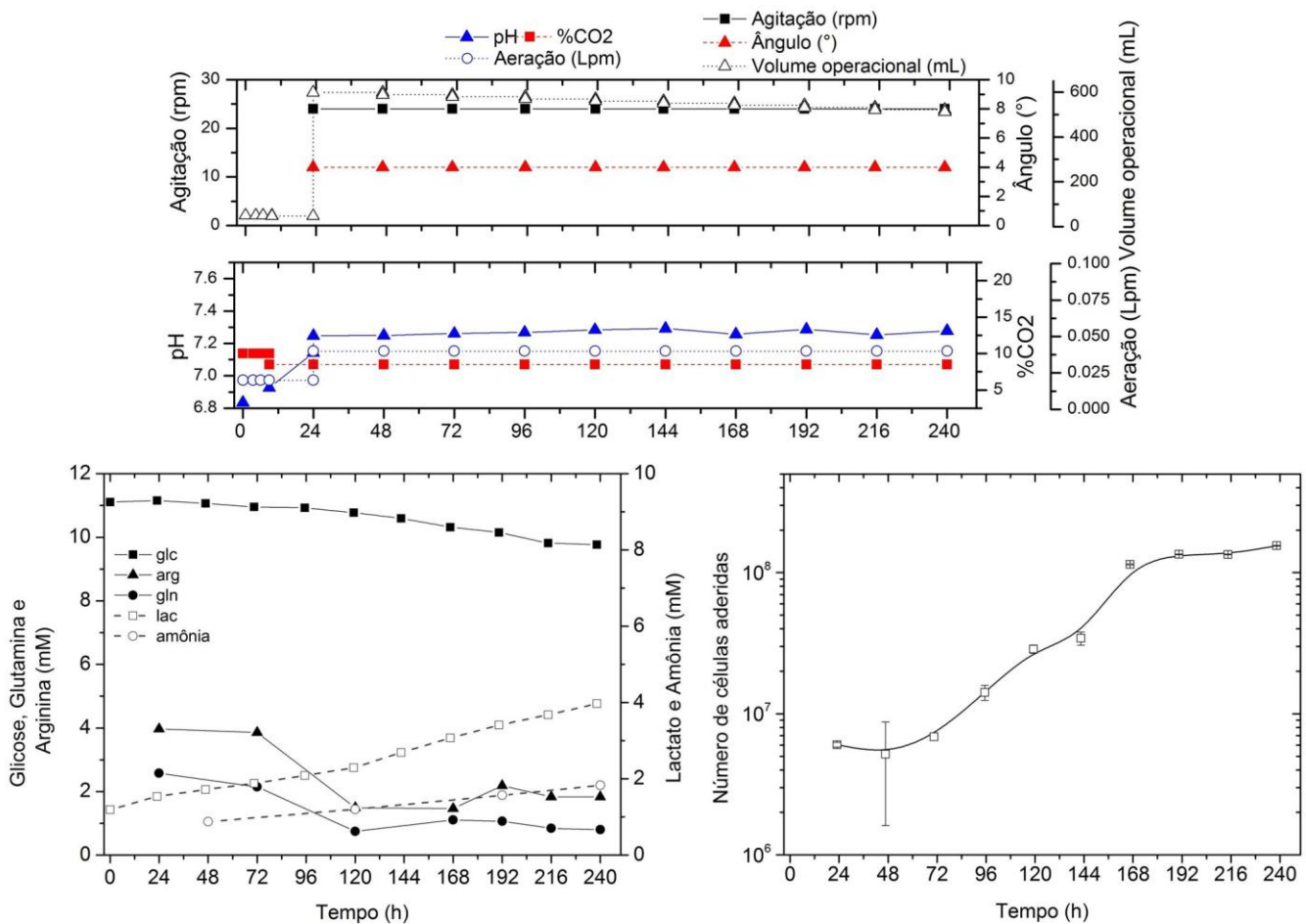
Cultivo $W_{\text{mod}2\text{CS}}$

No cultivo $W_{\text{mod}2\text{CS}}$ a fase de adesão foi realizada com volume de trabalho de 50 mL, menor que o aplicado no cultivo $W_{\text{mod}1\text{CS}}$ (75 mL), com objetivo de reduzir ainda mais a área de superfície molhada para evitar a sedimentação das células sobre o plástico da Cellbag.

Diferentemente do operado no cultivo $W_{\text{mod}1\text{CS}}$, a suspensão de microcarregadores e células foi homogeneizada manualmente após inoculação na Cellbag e, em seguida, a mesma foi mantida sem agitação durante as primeiras 24 h do cultivo. Após 24 h, 60% das células inoculadas estavam aderidas aos microcarregadores, de acordo com o dado obtido pelo método MTT.

Conforme analisado na Figura 45, não houve esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações máximas de lactato e amônia foram de 3,97 mM e 1,83 mM com 240 h de operação, respectivamente. Esses valores não são inibitórios para o cultivo da CTM-CU (SCHOP et al., 2009). A relação $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ foi de $1,25 \pm 0,40$ ($\text{mol}_{\text{lac}}/\text{mol}_{\text{glc}}$) durante a fase de crescimento, o que indica metabolismo eficiente de consumo de glicose, já que o $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ foi menor que $2,0 \text{ mol}_{\text{lac}}/\text{mol}_{\text{glc}}$ (SCHOP, 2010). O consumo específico médio de glicose foi de $0,17 \pm 0,09$ ($\text{pmol}_{\text{glc}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,21 \pm 0,15$ ($\text{pmol}_{\text{lac}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Figura 45. Cultivo W_{mod2CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator WaveTM. Concentração de CultiSpher-S[®] de 8,3 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 30. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



O fator de expansão celular alcançado considerando as células aderidas aos microcarregadores foi de 25,6 vezes, com 240 h, e de 15,5 vezes considerando o total de células inoculadas. A velocidade específica de crescimento foi de $0,027 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,921$), entre 96 e 168 h. A produtividade celular do cultivo foi de $3,6 \times 10^7 \text{ cel.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,41 \pm 0,01$, com 240 h.

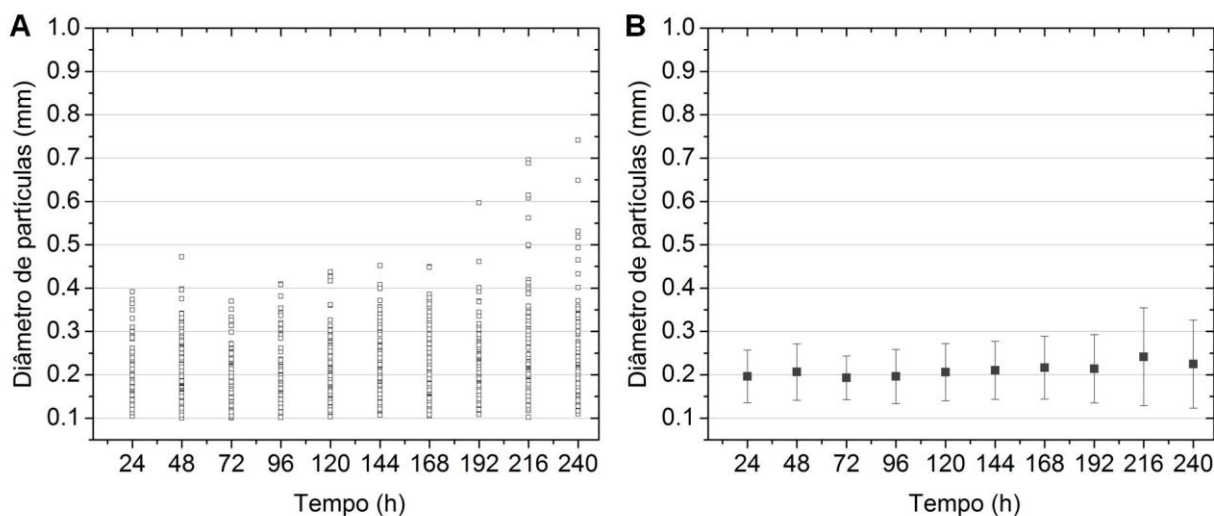
O fator de expansão celular elevado, em comparação ao cultivo $W_{\text{mod}1\text{CS}}$, pode ser relacionado ao menor volume inicial e à manutenção da Cellbag sem agitação durante as primeiras 24 h, fatores que podem ter influenciado o aumento do percentual de células aderidas aos microcarregadores. O maior período sem agitação permite que as células se fixem e se distribuam nos microcarregadores com mais facilidade, contribuindo para desempenho de expansão celular superior (JOSSEN et al., 2016; RAFIQ et al., 2013, 2016).

Até 216 h não se verificou depósito de microcarregadores no plástico da Cellbag, contudo, com 240 h ocorreu depósito de microcarregador com mais intensidade (nível 3), observado na Figura 46. A Figura 47 apresenta a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e o diâmetro médio de partículas ao longo do cultivo $W_{\text{mod}2\text{CS}}$. Foram verificados diâmetros máximos de 0,695 mm com 216 h e 0,741 mm com 240 h. O diâmetro médio máximo observado foi de $0,242 \pm 0,113$ mm, com 216 h.

Figura 46. Cultivo $W_{\text{mod}2\text{CS}}$: Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 240 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag.



Figura 47. Cultivo $W_{\text{mod}2\text{CS}}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



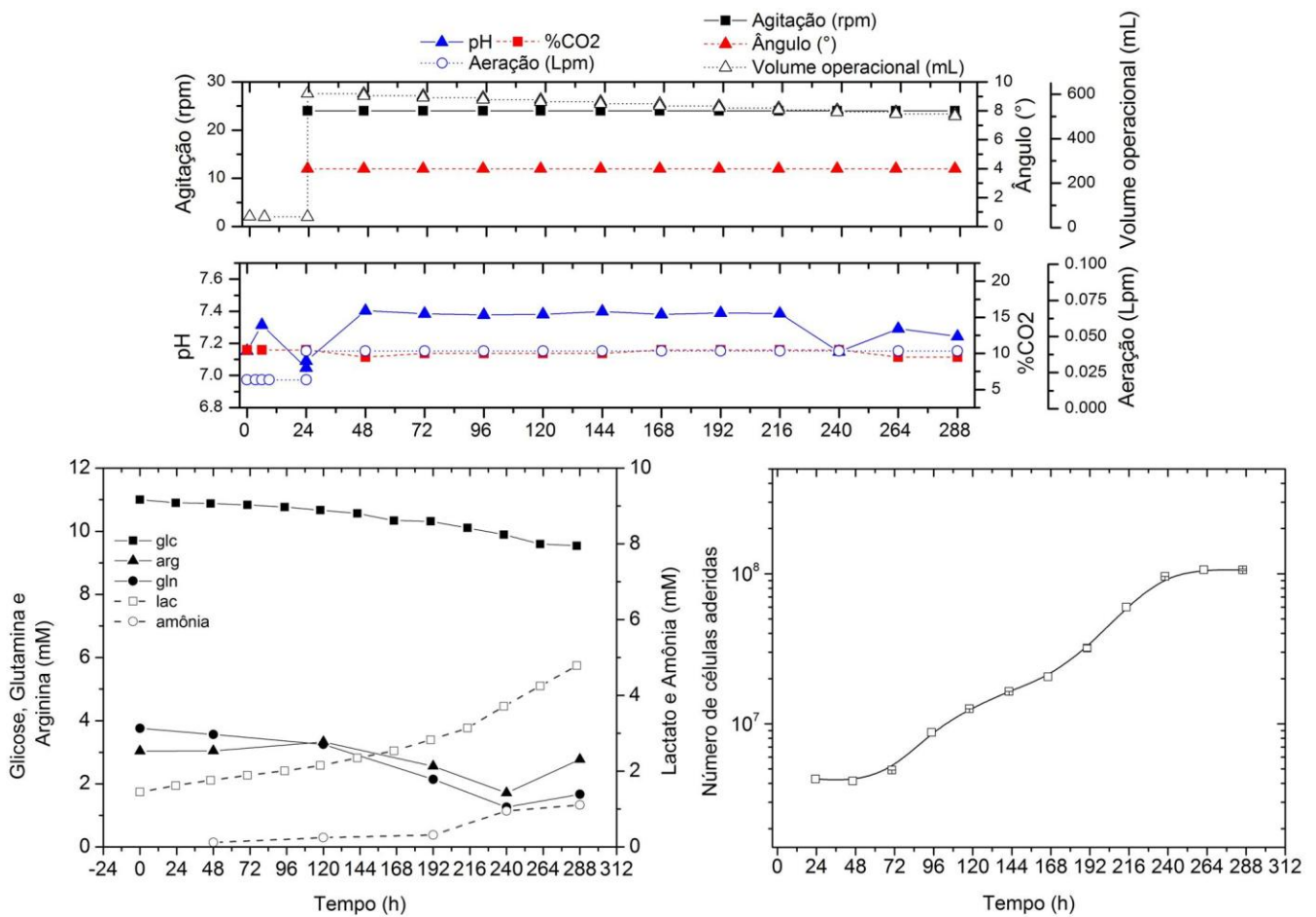
Cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$

O comportamento do cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ está apresentado na Figura 48. Assim como no $W_{\text{mod}2\text{CS}}$, a fase de adesão do cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ foi realizada com volume de trabalho de 50 mL e a Cellbag mantida sem agitação durante as primeiras 24 h. Diferentemente do aplicado no $W_{\text{mod}2\text{CS}}$, o $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ foi inoculado com relação de 16 células por microcarregador. Após 24 h, 77% das CTM-CU inoculadas estavam aderidas aos microcarregadores, de acordo com dado adquirido através do método MTT.

Não foi verificado esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações máximas de lactato e amônia foram de 4,70 mM e 1,11 mM com 288 h de operação, respectivamente. Esses valores não são inibitórios para o cultivo da CTM-CU (SCHOP et al., 2009). A relação $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ foi de $1,42 \pm 0,84$ ($\text{mol}_{\text{lac}}/\text{mol}_{\text{glc}}$) durante a fase de crescimento. O consumo específico médio de glicose foi de $0,18 \pm 0,14$ ($\text{pmol}_{\text{glc}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,18 \pm 0,04$ ($\text{pmol}_{\text{lac}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

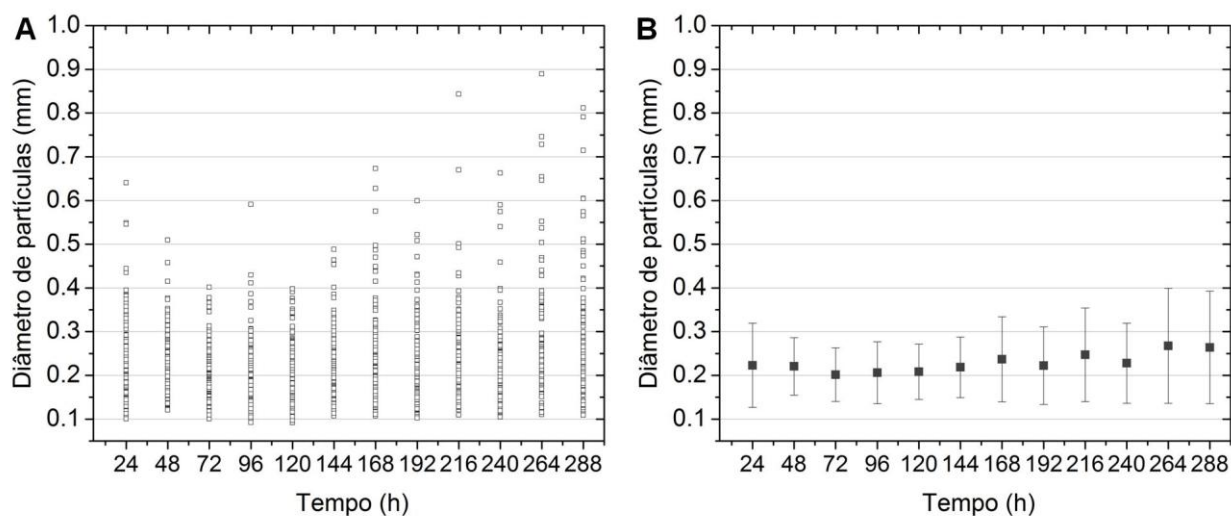
O fator de expansão celular alcançado considerando as células aderidas aos microcarregadores foi de 24,8 vezes, com 264 h, e de 19,3 vezes considerando o número de células inoculadas. A velocidade específica de crescimento foi de $0,021 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,995$), entre 168 e 240 h. A produtividade celular do cultivo foi de $2,0 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,27 \pm 0,01$, com 264 h.

Figura 48. Cultivo $W_{mod}3_{CS}$: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator WaveTM. Concentração de CultiSpher-S[®] de 8,3 e 0,7 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 16. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



A Figura 49 apresenta a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e o diâmetro médio de partículas ao longo do cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$. Foram verificados diâmetros máximos de 0,843 mm com 216 h e 0,889 mm com 264 h. O diâmetro médio máximo observado foi de $0,268 \pm 0,135$ mm, com 264 h. Foram verificados depósitos de microcarregadores nível 2 com 216 e 264 h de operação.

Figura 49. Cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.

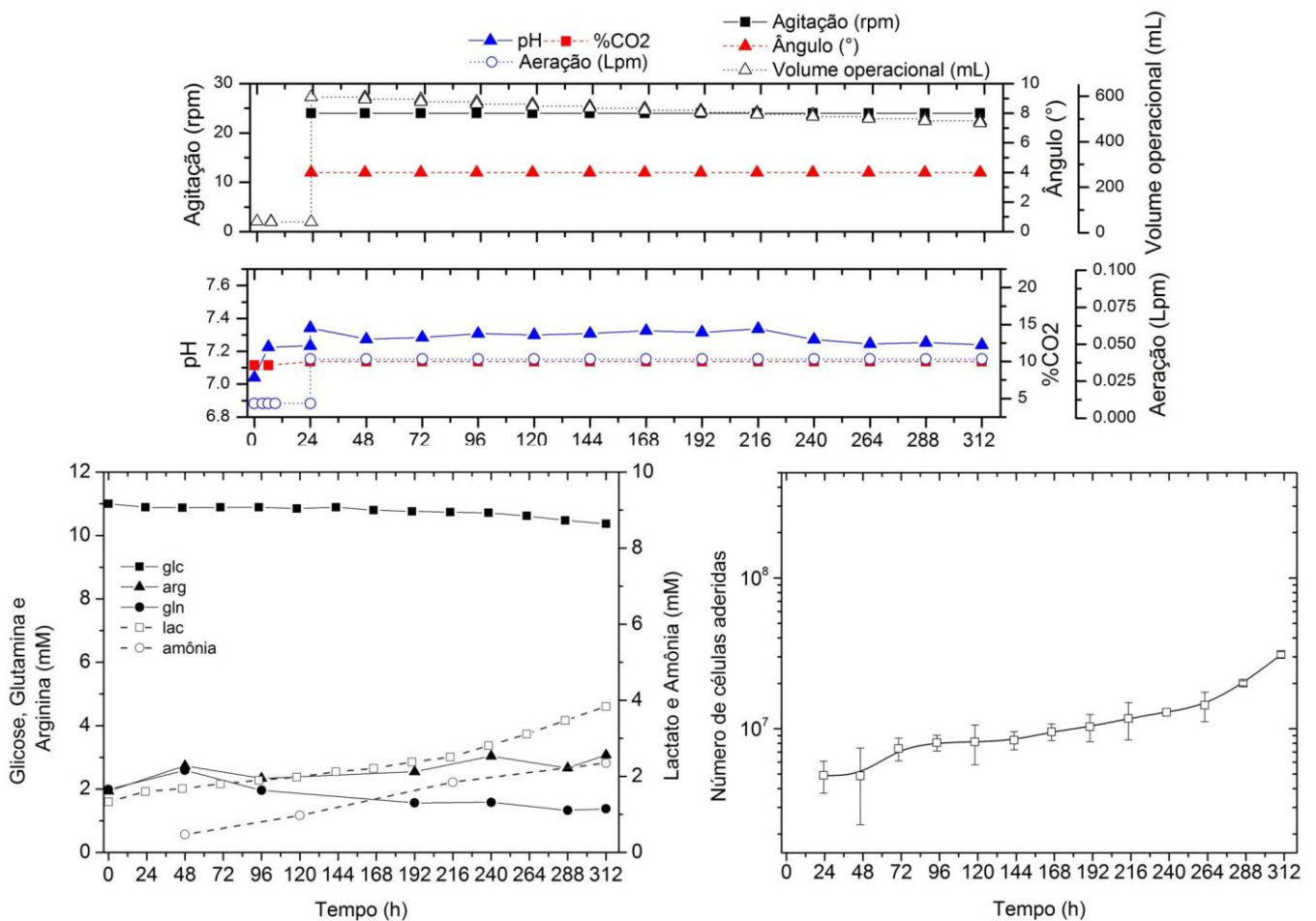


Cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$

A fase de adesão do cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$ foi realizada nas mesmas condições dos cultivos $W_{\text{mod}2\text{CS}}$ e $W_{\text{mod}3\text{CS}}$, exceto pela relação inoculada de células por microcarregador, sendo de 6 cel/MC, e pela concentração de microcarregador na fase de adesão e expansão, de 25,0 e 2,1 gMC/L, respectivamente. Na Figura 50 está apresentado o comportamento do cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$. Após 24 h, 79,4% das células estavam aderidas aos microcarregadores, de acordo com o dado obtido pelo método MTT.

Não foi verificado esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações máximas de lactato e amônia foram de 3,84 mM e 2,35 mM, com 312 h de operação, respectivamente. Esses valores não são inibitórios para o cultivo da CTM-CU (SCHOP et al., 2009). A relação $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ foi de $1,37 \pm 0,46$ ($\text{mol}_{\text{lac}}/\text{mol}_{\text{glc}}$) durante a fase de crescimento, o que indica metabolismo eficiente de consumo de glicose (SCHOP, 2010). O consumo específico médio de glicose foi de $0,26 \pm 0,06$ ($\text{pmol}_{\text{glc}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e a produção específica média de lactato foi de $0,35 \pm 0,10$ ($\text{pmol}_{\text{lac}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

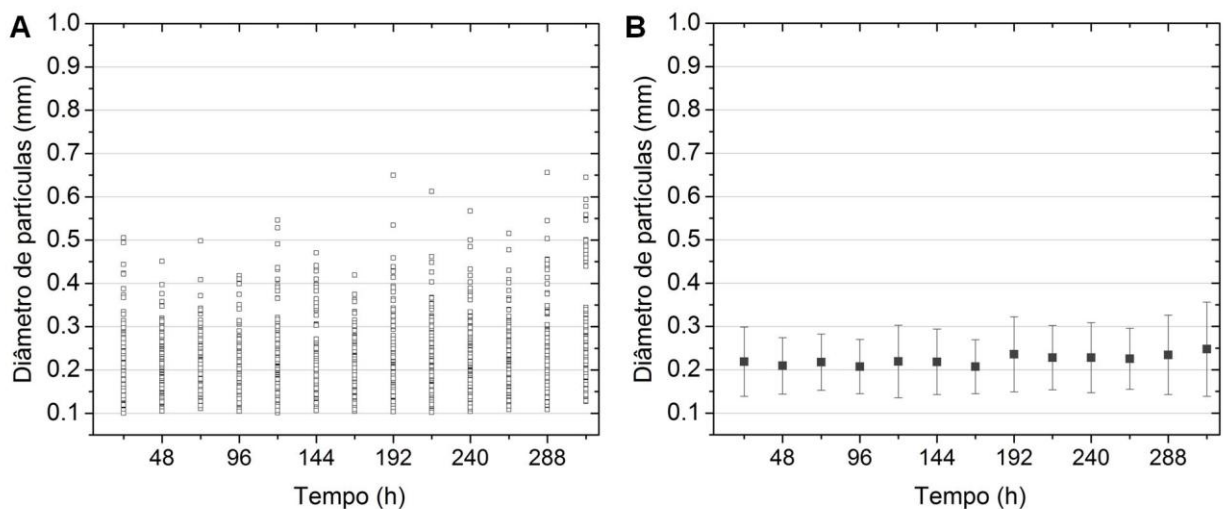
Figura 50. Cultivo W_{mod4CS} : Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator WaveTM. Concentração de CultiSpher-S[®] de 25,0 e 2,1 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 6. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.



O fator de expansão celular alcançado considerando as células aderidas aos microcarregadores foi de 6,3 vezes, com 312 h de operação, e de 5,0 vezes considerando o total de células inoculadas. A velocidade específica de crescimento foi de $0,008 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,942$), entre 192 e 312 h. A produtividade celular do cultivo foi de $0,4 \times 10^7 \text{ cel.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,24 \pm 0,02$, com 288 h.

A Figura 51 apresenta a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e o diâmetro médio de partículas ao longo do cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$. Foram verificados diâmetros máximos de 0,649 mm com 192 h e 0,656 mm com 288 h. O diâmetro médio máximo observado foi de $0,247 \pm 0,108 \text{ mm}$, ao término do cultivo. Mesmo com o menor crescimento, ocorreu deposição de microcarregadores nível 2 com maior frequência que a verificada no $W_{\text{mod}3\text{CS}}$. No $W_{\text{mod}4\text{CS}}$ foram verificados depósitos nível 2 com 96, 144, 240 e 312 h.

Figura 51. Cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



Cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$

Nos cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, obteve-se com 24 h, 71,8 e 77,2% de adesão das CTM-CU inoculadas aos microcarregadores, respectivamente. Os comportamentos dos cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$ estão apresentados nas Figuras 52 e 53, respectivamente.

Figura 52. Cultivo $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator WaveTM. Concentração de MAG de 30,0 e 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 10. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU.

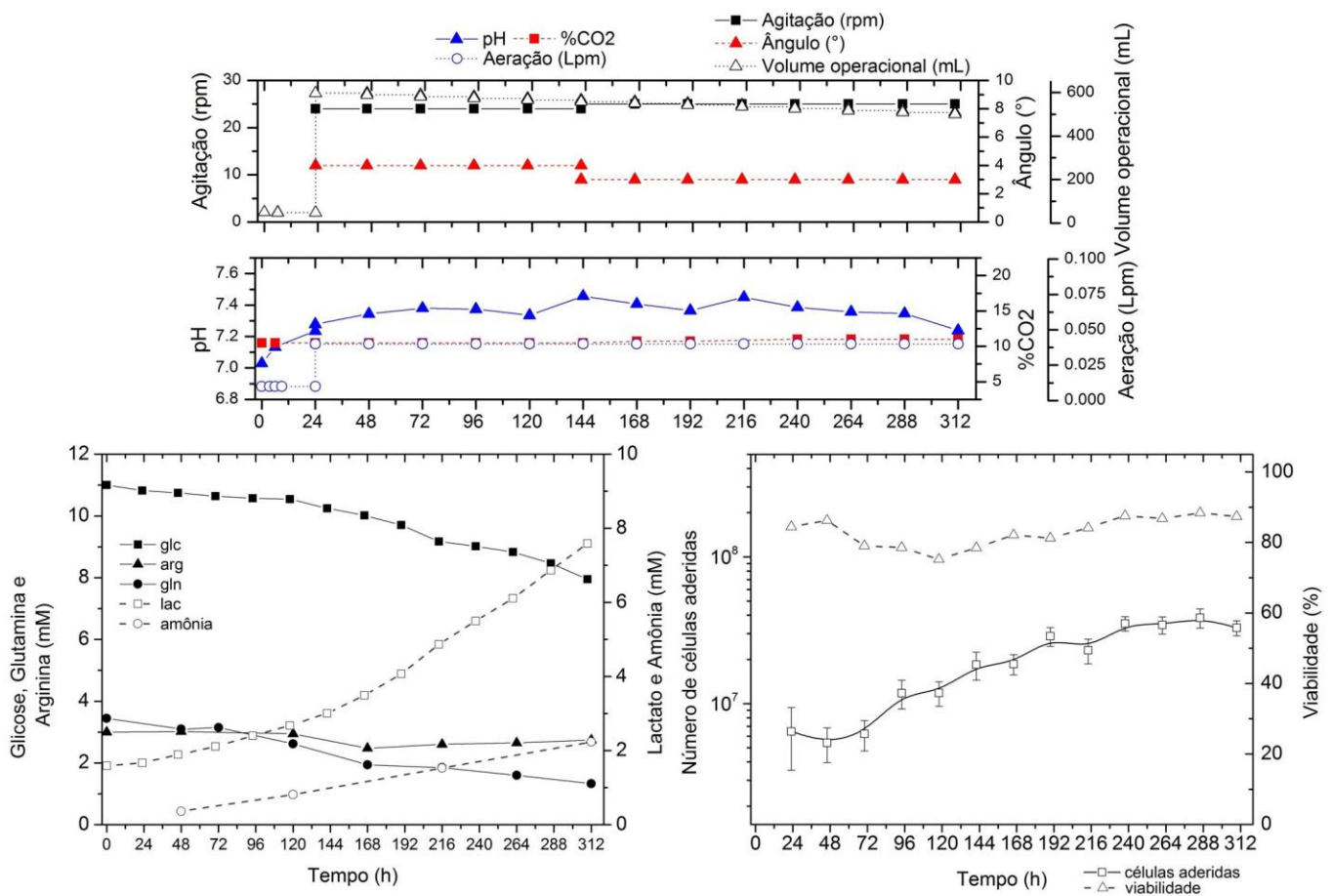
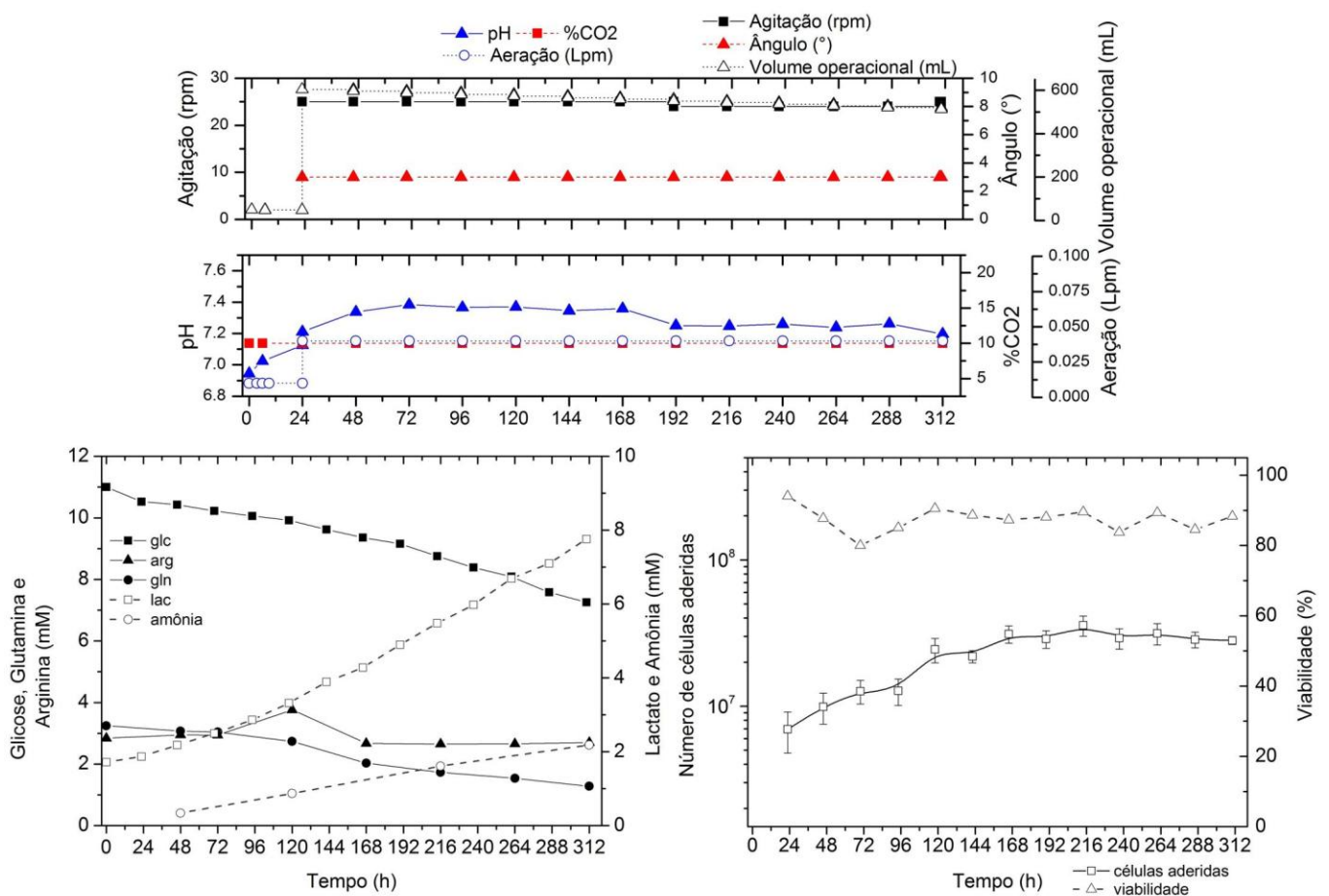


Figura 53. Cultivo $W_{mod2MAG}$: Cultivo da CTM-CU em meio de cultivo α -MEM sem fenol suplementado com glicose, glutamina, arginina, antibiótico (1% v/v) e SFB (10% v/v). Fases de adesão e expansão realizadas no Biorreator WaveTM. Concentração de MAG de 30,0 e 2,5 gMC/L nas fases de adesão e expansão, respectivamente, com relação célula/MC de 10. Volume de trabalho de 50 mL na fase de adesão e de 600 mL no início da fase de expansão. Cellbag mantida em modo estático durante a fase de adesão. Condições de operação do Biorreator WaveTM; dados de pH; níveis de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia presentes no meio de cultivo; número de CTM-CU aderidas aos microcarregadores e viabilidade das CTM-CU.



Em ambos os cultivos o pH manteve-se na faixa ideal, entre 6,8 - 7,4. Durante os procedimentos de manipulação dos microcarregadores MAG, foi observado que os mesmos tendem a aderir com mais facilidade em superfícies plásticas, o que pode ser devido às características estruturais do MAG (matriz de alginato e gelatina). Os depósitos do MAG nas superfícies laterais da Cellbag (região de borda líquido-gás) foram mais frequentes, quando comparados aos depósitos verificados nos cultivos

com o CultiSpher-S[®], prejudicando a expansão da CTM-CU devido à limitação de nutrientes e controle de pH nos microcarregadores depositados na Cellbag.

Durante o cultivo $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ foram verificados depósitos nível 3 em 120 e 144 h (Figura 54). Para tentar reduzir os depósitos, a agitação da Cellbag foi alterada de 24rpm/4° para 25rpm/3°, com 168 h, não sendo mais observados depósitos de microcarregadores no restante do cultivo. O $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$ foi operado com agitação de 25rpm/3° até 216 h, passando para 24rpm/3°. Mesmo com a menor agitação, nesse cultivo ocorreram depósitos nível 2 a partir de 144 h, sendo observados até o término da operação, com 312 h.

Figura 54. Cultivo $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$: Setas indicam depósito nível 3 de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, região de borda líquido-gás, observado com 144 h de operação. Localização do depósito indicada pelo retângulo pontilhado presente na vista superior da Cellbag.



Em ambos os cultivos o pH manteve-se na faixa ideal, entre 6,8 - 7,4. Não houve esgotamento dos principais nutrientes e as concentrações de lactato ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$: 7,59 mM e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$: 7,76 mM, com 312 h) e amônia ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$: 2,23 mM e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$: 2,18 mM, com 312 h) não atingiram níveis inibitórios para o crescimento da CTM-CU (SCHOP et al., 2009).

Durante a fase de crescimento, a relação entre o consumo de glicose e produção de lactato, $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$, apresentou valor de $1,72 \pm 0,71$ ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$) e $1,65 \pm 0,50$ ($W_{\text{mod}2\text{MAG}}$) ($\text{mol}_{\text{lac}}/\text{mol}_{\text{glc}}$). O consumo específico médio de glicose foi de $0,42 \pm 0,18$ ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$) e $0,33 \pm 0,12$ ($W_{\text{mod}2\text{MAG}}$) ($\text{pmol}_{\text{glc}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). A produção específica média de lactato foi de $0,62 \pm 0,15$ ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$) e $0,52 \pm 0,13$ ($W_{\text{mod}2\text{MAG}}$) ($\text{pmol}_{\text{lac}} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Os cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$ apresentaram maior produção específica média de lactato, em contraste com os demais cultivos realizados neste trabalho e com dados apresentados na literatura para expansão de CTM (CUNHA et al., 2017). Esses resultados podem indicar uma disfunção metabólica da CTM-CU, a qual pode estar relacionada ao estresse provocado devido aos sucessivos depósitos do MAG na superfície lateral da Cellbag.

Ao longo dos cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, a viabilidade das células recuperadas se manteve em torno de 85%. O fator de expansão celular obtido, com base nas células aderidas aos microcarregadores com 24 h, foi de 5,9 ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$; com 288 h) e de 5,1 ($W_{\text{mod}2\text{MAG}}$; com 216 h). Considerando o total de células inoculadas, o fator de expansão foi de 4,3 ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$) e de 3,9 ($W_{\text{mod}2\text{MAG}}$). A velocidade específica de crescimento foi de $0,012 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,945$), entre 72 e 192 h, para o $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e de $0,007 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,887$), entre 72 e 216 h, para o $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$. A produtividade celular dos cultivos foi de 0,7 e $0,6 \times 10^7 \text{ cel.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, para o $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, respectivamente.

O LDH máximo liberado no meio de cultivo (normalizado com relação ao LDH inicial) foi de $1,16 \pm 0,01$ ($W_{\text{mod}1\text{MAG}}$; com 216 h) e $1,06 \pm 0,01$ ($W_{\text{mod}2\text{MAG}}$; com 312 h). Mesmo com os depósitos do MAG na superfície lateral da Cellbag, previamente relatados, os cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$ não apresentaram níveis mais elevados de LDH liberado, o que pode ser explicado pela menor concentração de células nesses cultivos.

As Figuras 55 e 56 mostram a distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores e a variação do diâmetro médio de partículas ao longo dos cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, respectivamente. No $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$, com 192 h verificou-se o maior diâmetro de partícula, com 0,710 mm. O diâmetro médio máximo observado foi de $0,279 \pm 0,148$ mm, com 216 h de operação. No $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, foram verificados diâmetros máximos de 0,766 mm com 312 h e 0,795 mm com 48 h. O diâmetro médio máximo observado foi de $0,293 \pm 0,139$ mm, com 288 h.

Figura 55. Cultivo $W_{\text{mod}1_{\text{MAG}}}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.

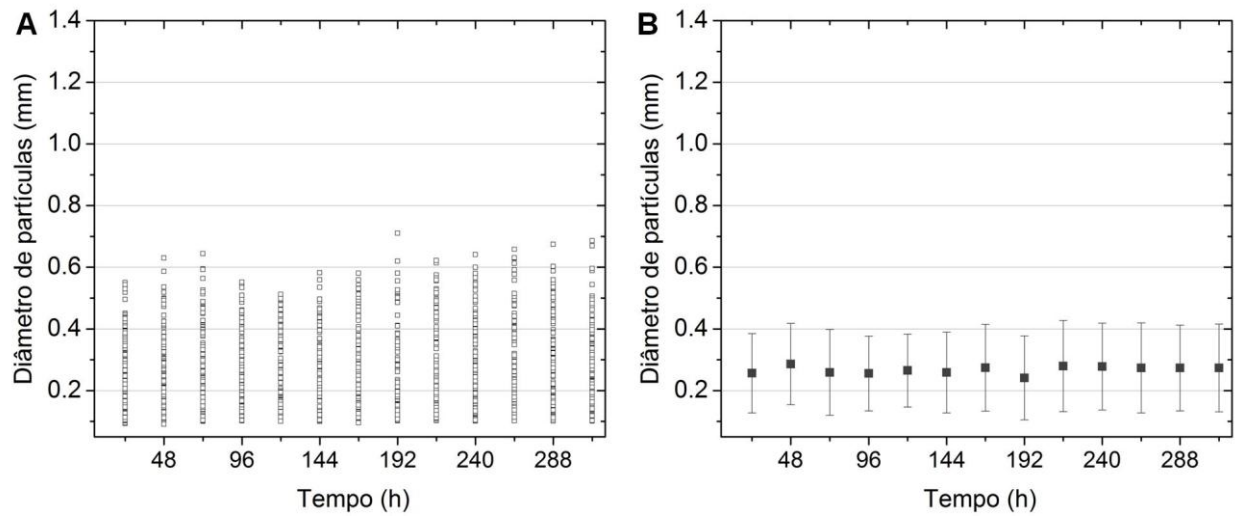
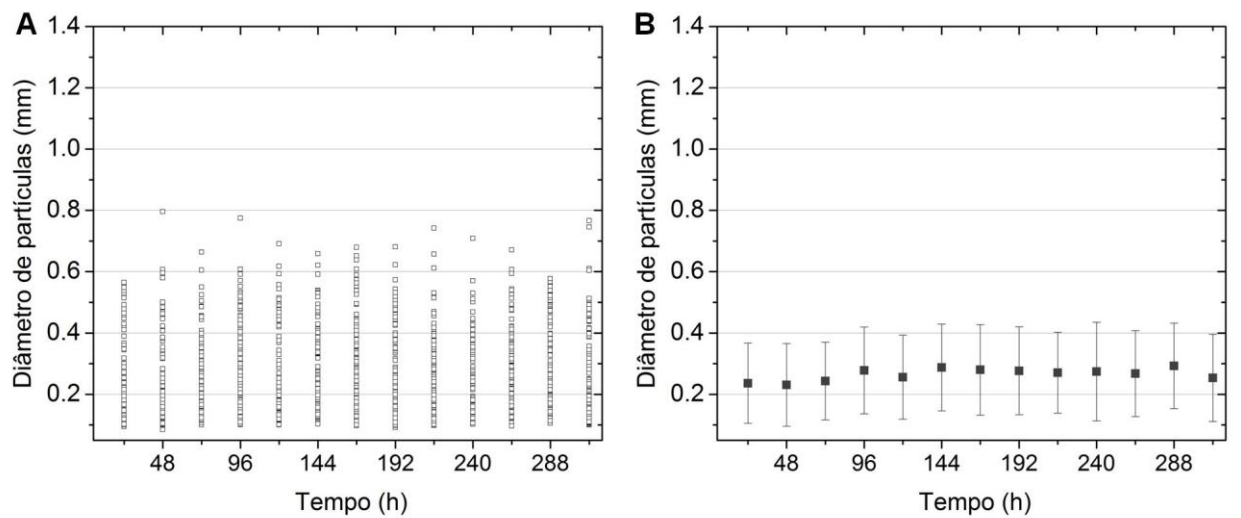


Figura 56. Cultivo $W_{\text{mod}2_{\text{MAG}}}$: (A) Distribuição do diâmetro de partículas de microcarregadores (\square) e (B) diâmetro médio de partículas de microcarregadores (\blacksquare) obtidos durante o cultivo da CTM-CU.



5.7. Avaliação dos requisitos de qualidade da CTM-CU ao término dos cultivos

Diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos

Conforme apresentado na Figura 57, as CTM-CU obtidas ao término dos cultivos em frasco spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} mantiveram o potencial de diferenciação *in vitro* em adipócitos, osteócitos e condrócitos, para os dois modelos de microcarregadores testados (CultiSpher-S[®] e MAG). Na Figura 57 observa-se a coloração de pontos de gordura na diferenciação em adipócitos, realizada após 14 dias de indução adipogênica; a coloração de depósitos de cálcio na diferenciação em osteócitos, realizada após 21 dias de indução osteogênica; e a coloração de proteoglicanos na diferenciação em condrócitos, realizada após 14 dias de indução condrogênica.

Imunofenotipagem

Através da análise de imunofenotipagem das CTM-CU obtidas ao término dos cultivos em frasco spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}, apresentada na Tabela 4, verificou-se que a maior parte da população de células exibiu expressão negativa para os marcadores CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR (< 3,0%) e expressão positiva para CD29, CD44, CD73, CD90 (> 90,2%). Esses resultados mostram que as CTM-CU, após os cultivos estudados, mantiveram o comportamento de expressão de marcadores de superfície condizentes com o perfil esperado para células-tronco mesenquimais (DOMINICI et al., 2006).

As CTM-CU apresentaram marcação do CD105 superior a 90% somente no cultivo Spinner_{CS} (91,2%). Os cultivos Spinner-Wave_{mod;CS}, Wave_{mod;CS} e Wave_{mod;MAG} e a condição da CTM-CU anterior aos cultivos (inóculo) apresentaram marcação do CD105 inferior a 90%.

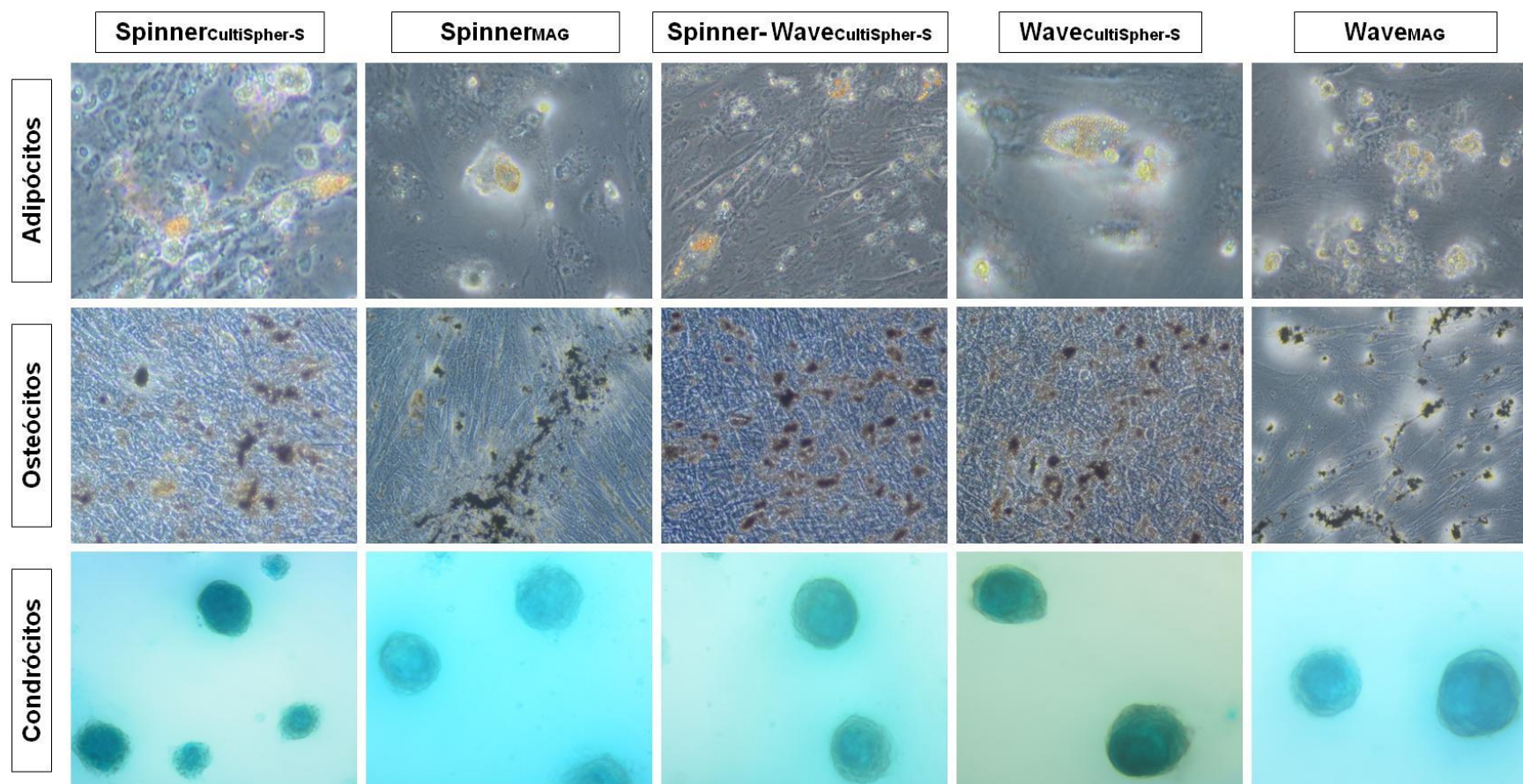
O CD105 (endoglina) é uma glicoproteína marcadora da membrana celular relacionado ao complexo TGF- β (fator de crescimento transformante-beta), atuando na angiogênese (DUFF et al., 2003). A baixa marcação do CD105 é relacionada à exposição da CTM-CU à enzima TrypleTM10x durante o procedimento de digestão dos microcarregadores para recuperação das células (BROWN et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2014; SIMÕES et al., 2013).

Dos Santos e colaboradores (2014) relataram a redução dos marcadores CD90 e CD105 para valores de 74% e 39% em CTMs de medula óssea recuperadas após cultivo em biorreator de tanque agitado, com agitação de 60 rpm e 20% de saturação com ar. Contudo, essa condição foi revertida após expansão das células recuperadas em frasco T, durante 5 dias, passando para 96% e 98% de expressão, respectivamente (DOS SANTOS et al., 2014).

Tabela 4. Resultados da análise de imunofenotipagem da CTM-CU na condição anterior aos cultivos e obtida ao término dos cultivos em frasco Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}.

Marcador	Antes da Expansão	S_{CS}	S_{MAG}	SW_{mod;CS}	W_{mod;CS}	W_{mod;MAG}
HLA-DR	1,0	0,4	0,3	1,4	0,4	0,6
CD14	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,2
CD29	92,8	99,7	99,2	94,9	99,3	94,6
CD31	0,0	0,2	1,2	0,4	0,4	1,5
CD34	1,8	3,0	1,8	0,0	1,6	0,1
CD44	96,8	99,0	98,9	91,4	99,0	90,2
CD45	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,2
CD73	90,2	99,7	98,5	93,5	98,9	93,7
CD90	99,5	99,2	99,4	95,4	97,8	97,6
CD105	84,1	91,2	84,3	86,2	89,4	73,4

Figura 57. Análise de diferenciação das CTM-CU obtidas ao término dos cultivos em frasco Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}. Diferenciação em adipócitos evidenciada pela coloração com Sudan II. Diferenciação em osteócitos evidenciada pela coloração com nitrato de prata 5%. Diferenciação em condrócitos evidenciada pela coloração com Azul de alciano 1%. Magnificação: 100x (osteócitos e condrócitos) e 200x (adipócitos).



Padrões de expressão gênica global da CTM-CU coletada dos cultivos em Biorreator Wave™ e frasco Spinner

O padrão de expressão gênica global das CTM-CU coletadas ao término dos cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} foi avaliado por análise do tipo *microarray*, tendo como condição controle a CTM-CU expandida em frasco de cultura (modo 2D-estático).

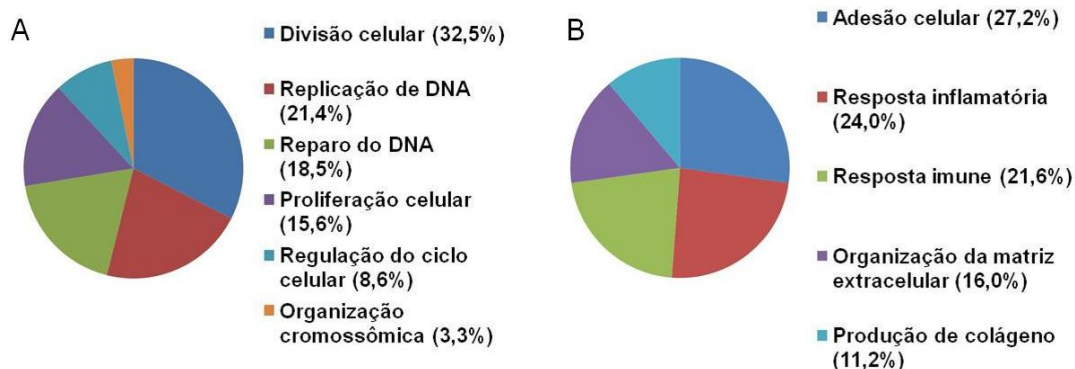
No cultivo em frasco spinner com microcarregador CultiSpher-S®, $S2_{CS}$, foram obtidos 1.024 genes com regulação positiva e 1.038 genes com regulação negativa ($p < 0,05$ e $FC > 2,0$). No cultivo em frasco spinner com microcarregador MAG, $S2_{MAG}$, foram registrados 607 genes com regulação positiva e 770 genes com regulação negativa ($p < 0,05$ e $FC > 2,0$). O cultivo no Biorreator Wave™ com microcarregador CultiSpher-S®, W_{mod3CS} , apresentou 924 genes com regulação positiva e 836 genes com regulação negativa ($p < 0,05$ e $FC > 2,0$). Dentre esses genes, foram registrados simultaneamente para os cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} , 519 genes com regulação positiva e 670 com regulação negativa.

Conforme observado na Figura 58, considerando os cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} , foram identificados genes com regulação positiva que estavam ligados aos processos de adesão celular, resposta inflamatória, resposta imune, organização da matriz extracelular e produção de colágeno. Já os genes com regulação negativa estavam ligados, na sua maioria, aos processos de crescimento celular, reparo e organização do material genético. A regulação negativa desse conjunto de genes obtida nas CTM-CU dos cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} pode estar ligada ao fato de as CTM-CU terem sido coletadas quando os cultivos já se encontravam no período de estagnação do crescimento, e comparadas às CTM-CU obtidas em modo 2D-estático, coletadas no período de crescimento exponencial, com velocidade específica de crescimento de $0,027 \text{ h}^{-1}$, fase em que a maquinaria celular está no auge de sua atividade de síntese de material genético. Genes descritos como importantes marcadores da condição funcional das CTMs, como NANOG, OCT4 e SOX2, não apresentaram diferença significativa na expressão obtida entre as CTM-CU coletadas nos cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} , com relação à condição controle em modo 2D-estático.

O gene FGF1, ligado à proliferação celular, apresentou regulação negativa de -5,35 ($S2_{CS}$), -4,11 ($S2_{MAG}$), e -5,41 (W_{mod3CS}), respectivamente. O gene FOXM1, o qual está envolvido na regulação do ciclo celular, apresentou regulação negativa de -5,49 ($S2_{CS}$), -3,23 ($S2_{MAG}$), e -2,88 (W_{mod3CS}). CLSPN, XRCC3, XRCC2 e EID3 são exemplos de genes que estão envolvidos no reparo do material genético. A menor

regulação negativa desses genes foi de -5,49 ($S2_{CS}$), -2,35 ($S2_{CS}$), -2,50 ($S2_{MAG}$) e -2,58 (W_{mod3CS}), respectivamente.

Figura 58. Distribuição percentual de genes ligados às funções biológicas identificadas da CTM-CU com (A) regulação negativa e (B) regulação positiva, obtidas nos cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} , tendo como condição controle a CTM-CU expandida em modo 2D-estático.



As Tabelas 5, 6 e 7 apresentam a lista dos 50 genes com menor regulação negativa, obtidos no $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} , respectivamente. A menor regulação negativa obtida nos cultivos $S2_{CS}$ e $S2_{MAG}$ foi apresentada pelo gene OXTR, com FC de -15,38 e -15,15, respectivamente. O gene OXTR está relacionado com expressão de receptor de quimiocina. No W_{mod3CS} , o OXTR apresentou FC de -9,52 (quarto gene com menor regulação negativa). Nesse cultivo, o gene DHRS9 apresentou a menor regulação negativa, o qual está relacionado a atividade do NAD e desidrogenases, apresentando FC de -12,20. Nos cultivos $S2_{CS}$ e $S2_{MAG}$, o DHRS9 apresentou FC de -6,06 e -7,04, respectivamente.

A maior regulação positiva observada nos cultivos $S2_{CS}$ e $S2_{MAG}$ correspondeu ao gene MMP3, com FC de 202,30 e 152,72 vezes, respectivamente. O MMP3 está relacionado aos processos de regulação da matriz extracelular. Esse aumento é justificado pelo elevado grau de agregação de microcarregadores dos cultivos $S2_{CS}$ e $S2_{MAG}$, no momento de coleta das CTM-CU. No W_{mod3CS} , o MMP3 apresentou FC de 47,30 vezes, o segundo gene com maior regulação positiva nesse cultivo.

No W_{mod3CS} , o gene TNXB apresentou a maior regulação positiva, com FC de 78,44 vezes. O TNXB é ligado aos processos de formação de colágeno. No $S2_{CS}$ e $S2_{MAG}$, o TNXB apresentou FC de 2,33 e 22,44 vezes, respectivamente. Evidenciando que, embora em fase já avançada e com grande agregação, o cultivo no $S2_{MAG}$ permanecia com processo de formação de colágeno, e em maior intensidade que no $S2_{CS}$. As Tabelas 8, 9 e 10 listam os 50 genes com maior regulação positiva nos cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} .

Tabela 5. Relação dos 50 genes com menor regulação negativa após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador CultiSpher-S®.

Down	Símbolo	FC	Log ₂ (FC)	Descrição
1	OXTR	-15.42	-3.95	Homo sapiens oxytocin receptor (OXTR), mRNA [NM_000916]
2	KCNN2	-14.33	-3.84	Homo sapiens potassium channel, calcium activated intermediate/small conductance subfamily N alpha, member 2 (KCNN2), transcript variant 1, mRNA [NM_021614]
3	CD177	-10.89	-3.44	Homo sapiens CD177 molecule (CD177), mRNA [NM_020406]
4	SBSPON	-10.84	-3.44	Homo sapiens somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing (SBSPON), mRNA [NM_153225]
5	ANXA3	-10.78	-3.43	Homo sapiens annexin A3 (ANXA3), mRNA [NM_005139]
6	KRT19	-10.55	-3.40	Homo sapiens keratin 19, type I (KRT19), mRNA [NM_002276]
7	ROR1	-10.15	-3.34	Homo sapiens receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1), transcript variant 1, mRNA [NM_005012]
8	NOG	-10.12	-3.34	Homo sapiens noggin (NOG), mRNA [NM_005450]
9	ROR1	-9.57	-3.26	Homo sapiens receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1), transcript variant 1, mRNA [NM_005012]
10	CCDC85A	-9.14	-3.19	Homo sapiens coiled-coil domain containing 85A (CCDC85A), mRNA [NM_001080433]
11	KRT19P2	-8.90	-3.15	Homo sapiens keratin 19 pseudogene 2 (KRT19P2), non-coding RNA [NR_036685]
12	CDCA7	-8.87	-3.15	Homo sapiens cell division cycle associated 7 (CDCA7), transcript variant 1, mRNA [NM_031942]
13	FHL1	-8.83	-3.14	Homo sapiens four and a half LIM domains 1 (FHL1), transcript variant 4, mRNA [NM_001159704]
14	PTX3	-8.82	-3.14	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]
15	RRM2	-8.56	-3.10	Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 (RRM2), transcript variant 2, mRNA [NM_001034]
16	RTP3	-8.53	-3.09	Homo sapiens receptor (chemosensory) transporter protein 3 (RTP3), mRNA [NM_031440]
17	LMNB1	-8.06	-3.01	Homo sapiens lamin B1 (LMNB1), transcript variant 1, mRNA [NM_005573]
18	ARHGAP23	-7.84	-2.97	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 23 (ARHGAP23), mRNA [NM_001199417]
19	SNAR-G2	-7.75	-2.95	Homo sapiens small ILF3/NF90-associated RNA G2 (SNAR-G2), small nuclear RNA [NR_024244]
20	MAP7D3	-7.49	-2.91	Homo sapiens MAP7 domain containing 3 (MAP7D3), transcript variant 3, mRNA [NM_001173517]
21	MYPN	-7.46	-2.90	Homo sapiens myopalladin (MYPN), transcript variant 1, mRNA [NM_032578]
22	ACTG2	-7.37	-2.88	Homo sapiens cDNA, FLJ17257, [AK310215]
23	TK1	-7.28	-2.86	Homo sapiens thymidine kinase 1, soluble (TK1), mRNA [NM_003258]
24	BRIP1	-7.25	-2.86	Homo sapiens BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 (BRIP1), mRNA [NM_032043]
25	UHRF1	-6.95	-2.80	Homo sapiens ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 (UHRF1), transcript variant 2, mRNA [NM_013282]
26	TYMS	-6.88	-2.78	Homo sapiens thymidylate synthetase (TYMS), mRNA [NM_001071]
27	EDN1	-6.83	-2.77	Homo sapiens endothelin 1 (EDN1), transcript variant 1, mRNA [NM_001955]
28	PSG8	-6.82	-2.77	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8 (PSG8), transcript variant 1, mRNA [NM_182707]
29	CENPI	-6.81	-2.77	Homo sapiens centromere protein I (CENPI), mRNA [NM_006733]
30	MKI67	-6.59	-2.72	Homo sapiens marker of proliferation Ki-67 (MKI67), transcript variant 1, mRNA [NM_002417]
31	DMC1	-6.53	-2.71	Homo sapiens DNA meiotic recombinase 1 (DMC1), transcript variant 1, mRNA [NM_007068]
32	ZWINT	-6.52	-2.70	Homo sapiens ZW10 interacting kinetochore protein (ZWINT), transcript variant 2, mRNA [NM_032997]
33	CDCA8	-6.34	-2.66	Homo sapiens cell division cycle associated 8 (CDCA8), transcript variant 2, mRNA [NM_018101]
34	CEP55	-6.26	-2.65	Homo sapiens centrosomal protein 55kDa (CEP55), transcript variant 1, mRNA [NM_018131]

5. RESULTADOS

35	NCAPG	-6.14	-2.62	Homo sapiens non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG), transcript variant 1, mRNA [NM_022346]
36	CDC20	-6.11	-2.61	Homo sapiens cell division cycle 20 (CDC20), mRNA [NM_001255]
37	STIL	-6.08	-2.60	Homo sapiens SCL/TAL1 interrupting locus (STIL), transcript variant 3, mRNA [NM_001282936]
38	DHRS9	-6.05	-2.60	Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 (DHRS9), transcript variant 3, mRNA [NM_001142270]
39	UCP2	-6.05	-2.60	Homo sapiens uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (UCP2), mRNA [NM_003355]
40	KIAA0101	-6.04	-2.59	Homo sapiens KIAA0101 (KIAA0101), transcript variant 1, mRNA [NM_014736]
41	ARHGAP23	-6.00	-2.59	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 23 (ARHGAP23), mRNA [NM_001199417]
42	TPX2	-6.00	-2.58	Homo sapiens TPX2, microtubule-associated (TPX2), mRNA [NM_012112]
43	FAM46B	-5.96	-2.58	Homo sapiens family with sequence similarity 46, member B (FAM46B), mRNA [NM_052943]
44	FAM86EP	-5.96	-2.57	Homo sapiens family with sequence similarity 86, member E, pseudogene (FAM86EP), non-coding RNA [NR_024253]
45	LZTS1	-5.93	-2.57	Homo sapiens leucine zipper, putative tumor suppressor 1 (LZTS1), mRNA [NM_021020]
46	HIST1H4C	-5.92	-2.57	Homo sapiens histone cluster 1, H4c (HIST1H4C), mRNA [NM_003542]
47	CDKN3	-5.92	-2.57	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3), transcript variant 1, mRNA [NM_005192]
48	GSG1	-5.92	-2.57	Homo sapiens germ cell associated 1 (GSG1), transcript variant 1, mRNA [NM_031289]
49	CENPF	-5.87	-2.55	Homo sapiens centromere protein F, 350/400kDa (CENPF), mRNA [NM_016343]
50	PLCE1-AS1	-5.86	-2.55	Homo sapiens PLCE1 antisense RNA 1 (PLCE1-AS1), long non-coding RNA [NR_033969]

Tabela 6. Relação dos 50 genes com menor regulação negativa após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador MAG.

Down	Símbolo	FC	Log ₂ (FC)	Descrição
1	OXTR	-15.24	-3.93	Homo sapiens oxytocin receptor (OXTR), mRNA [NM_000916]
2	CDC47	-14.97	-3.90	Homo sapiens cell division cycle associated 7 (CDC47), transcript variant 1, mRNA [NM_031942]
3	CCDC85A	-14.78	-3.89	Homo sapiens coiled-coil domain containing 85A (CCDC85A), mRNA [NM_001080433]
4	DLX2	-12.17	-3.60	Homo sapiens distal-less homeobox 2 (DLX2), mRNA [NM_004405]
5	PTX3	-9.42	-3.24	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]
6	ANXA3	-9.32	-3.22	Homo sapiens annexin A3 (ANXA3), mRNA [NM_005139]
7	NOG	-9.29	-3.22	Homo sapiens noggin (NOG), mRNA [NM_005450]
8	KCNN2	-9.23	-3.21	Homo sapiens potassium channel, calcium activated intermediate/small conductance subfamily N alpha, member 2 (KCNN2), transcript variant 1, mRNA [NM_021614]
9	KRT19	-9.21	-3.20	Homo sapiens keratin 19, type I (KRT19), mRNA [NM_002276]
10	ALDH1A1	-8.95	-3.16	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (ALDH1A1), mRNA [NM_000689]
11	ST6GALNAC3	-7.76	-2.96	Homo sapiens ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3 (ST6GALNAC3), transcript variant 2, mRNA [NM_001160011]
12	ID4	-7.71	-2.95	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein (ID4), mRNA [NM_001546]
13	LRRC2	-7.60	-2.93	Homo sapiens leucine rich repeat containing 2 (LRRC2), mRNA [NM_024512]
14	KRT19P2	-7.46	-2.90	Homo sapiens keratin 19 pseudogene 2 (KRT19P2), non-coding RNA [NR_036685]
15	CD177	-7.42	-2.89	Homo sapiens CD177 molecule (CD177), mRNA [NM_020406]
16	EDN1	-7.32	-2.87	Homo sapiens endothelin 1 (EDN1), transcript variant 1, mRNA [NM_001955]
17	PCLO	-7.09	-2.83	Homo sapiens piccolo presynaptic cytomatrix protein (PCLO), transcript variant 2, mRNA [NM_014510]
18	SBSPON	-7.07	-2.82	Homo sapiens somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing (SBSPON), mRNA [NM_153225]
19	DHRS9	-7.04	-2.82	Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 (DHRS9), transcript variant 3, mRNA [NM_001142270]
20	PLCE1-AS1	-7.01	-2.81	Homo sapiens PLCE1 antisense RNA 1 (PLCE1-AS1), long non-coding RNA [NR_033969]
21	FHL1	-6.98	-2.80	Homo sapiens four and a half LIM domains 1 (FHL1), transcript variant 4, mRNA [NM_001159704]
22	ID1	-6.92	-2.79	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1), transcript variant 1, mRNA [NM_002165]
23	NR4A3	-6.90	-2.79	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3), transcript variant 4, mRNA [NM_173199]
24	PSG8	-6.87	-2.78	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8 (PSG8), transcript variant 1, mRNA [NM_182707]
25	SLC7A4	-6.58	-2.72	Homo sapiens solute carrier family 7, member 4 (SLC7A4), mRNA [NM_004173]
26	ZNF331	-6.45	-2.69	zinc finger protein 331 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15489] [ENST00000509069]
27	CENPI	-6.19	-2.63	Homo sapiens centromere protein I (CENPI), mRNA [NM_006733]
28	LMNB1	-6.15	-2.62	Homo sapiens lamin B1 (LMNB1), transcript variant 1, mRNA [NM_005573]
29	BMP4	-6.14	-2.62	Homo sapiens bone morphogenetic protein 4 (BMP4), transcript variant 1, mRNA [NM_001202]
30	RTP3	-6.05	-2.60	Homo sapiens receptor (chemosensory) transporter protein 3 (RTP3), mRNA [NM_031440]
31	ACTG2	-6.02	-2.59	Homo sapiens cDNA, FLJ17257, [AK310215]
32	PSG8	-5.92	-2.57	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8 (PSG8), transcript variant 1, mRNA [NM_182707]
33	BCOR	-5.81	-2.54	BCL6 corepressor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:20893]

5. RESULTADOS

[ENST00000615339]				
34	KCNJ13	-5.76	-2.53	Homo sapiens potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 13 (KCNJ13), transcript variant 1, mRNA [NM_002242]
35	UCP2	-5.72	-2.52	Homo sapiens uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (UCP2), mRNA [NM_003355]
36	TYMS	-5.69	-2.51	Homo sapiens thymidylate synthetase (TYMS), mRNA [NM_001071]
37	TK1	-5.65	-2.50	Homo sapiens thymidine kinase 1, soluble (TK1), mRNA [NM_003258]
38	TENM2	-5.64	-2.50	Homo sapiens teneurin transmembrane protein 2 (TENM2), mRNA [NM_001122679]
39	ADARB1	-5.64	-2.50	Homo sapiens adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (ADARB1), transcript variant 4, non-coding RNA [NR_027673]
40	SNAR-G2	-5.61	-2.49	Homo sapiens small ILF3/NF90-associated RNA G2 (SNAR-G2), small nuclear RNA [NR_024244]
41	KBTBD11	-5.59	-2.48	Homo sapiens kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11 (KBTBD11), mRNA [NM_014867]
42	CDC48	-5.52	-2.46	Homo sapiens cell division cycle associated 8 (CDC48), transcript variant 2, mRNA [NM_018101]
43	FAM46B	-5.51	-2.46	Homo sapiens family with sequence similarity 46, member B (FAM46B), mRNA [NM_052943]
44	PPP2R2B	-5.50	-2.46	Homo sapiens protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta (PPP2R2B), transcript variant 10, mRNA [NM_001271948]
45	ARAP2	-5.39	-2.43	Homo sapiens ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (ARAP2), mRNA [NM_015230]
46	LRRTM3	-5.38	-2.43	Homo sapiens leucine rich repeat transmembrane neuronal 3 (LRRTM3), transcript variant 1, mRNA [NM_178011]
47	GSG1	-5.37	-2.43	Homo sapiens germ cell associated 1 (GSG1), transcript variant 1, mRNA [NM_031289]
48	PKP2	-5.36	-2.42	Homo sapiens plakophilin 2 (PKP2), transcript variant 2b, mRNA [NM_004572]
49	ZWINT	-5.36	-2.42	Homo sapiens ZW10 interacting kinetochore protein (ZWINT), transcript variant 2, mRNA [NM_032997]
50	OGFRL1	-5.23	-2.39	Homo sapiens opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1), mRNA [NM_024576]

Tabela 7. Relação dos 50 genes com menor regulação negativa após cultivo da CTM-CU no Biorreator Wave™ com microcarregador CultiSpher-S®.

Down	Símbolo	FC	Log ₂ (FC)	Descrição
1	DHRS9	-12.23	-3.61	Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 (DHRS9), transcript variant 3, mRNA [NM_001142270]
2	DLX2	-11.84	-3.57	Homo sapiens distal-less homeobox 2 (DLX2), mRNA [NM_004405]
3	CDCA7	-11.08	-3.47	Homo sapiens cell division cycle associated 7 (CDCA7), transcript variant 1, mRNA [NM_031942]
4	OXTR	-9.55	-3.25	Homo sapiens oxytocin receptor (OXTR), mRNA [NM_000916]
5	SBSPON	-9.42	-3.24	Homo sapiens somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing (SBSPON), mRNA [NM_153225]
6	ANXA3	-9.21	-3.20	Homo sapiens annexin A3 (ANXA3), mRNA [NM_005139]
7	ID1	-8.88	-3.15	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1), transcript variant 1, mRNA [NM_002165]
8	CD177	-8.63	-3.11	Homo sapiens CD177 molecule (CD177), mRNA [NM_020406]
9	LRRC2	-8.57	-3.10	Homo sapiens leucine rich repeat containing 2 (LRRC2), mRNA [NM_024512]
10	LRRC2	-8.47	-3.08	Homo sapiens leucine rich repeat containing 2 (LRRC2), mRNA [NM_024512]
11	PTX3	-7.88	-2.98	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]
12	ID4	-7.82	-2.97	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein (ID4), mRNA [NM_001546]
13	MYL10	-7.56	-2.92	Homo sapiens myosin, light chain 10, regulatory (MYL10), mRNA [NM_138403]
14	ALDH1A1	-7.50	-2.91	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (ALDH1A1), mRNA [NM_000689]
15	PADI1	-7.35	-2.88	Homo sapiens peptidyl arginine deiminase, type I (PADI1), mRNA [NM_013358]
16	DUSP2	-7.26	-2.86	Homo sapiens dual specificity phosphatase 2 (DUSP2), mRNA [NM_004418]
17	NRARP	-7.23	-2.85	Homo sapiens NOTCH-regulated ankyrin repeat protein (NRARP), mRNA [NM_001004354]
18	CENPI	-7.13	-2.83	Homo sapiens centromere protein I (CENPI), mRNA [NM_006733]
19	GBP4	-6.92	-2.79	Homo sapiens guanylate binding protein 4 (GBP4), mRNA [NM_052941]
20	NOG	-6.53	-2.71	Homo sapiens noggin (NOG), mRNA [NM_005450]
21	CENPI	-6.17	-2.63	Homo sapiens centromere protein I (CENPI), mRNA [NM_006733]
22	MYPN	-6.12	-2.61	Homo sapiens myopalladin (MYPN), transcript variant 1, mRNA [NM_032578]
23	KCNN2	-6.08	-2.60	Homo sapiens potassium channel, calcium activated intermediate/small conductance subfamily N alpha, member 2 (KCNN2), transcript variant 1, mRNA [NM_021614]
24	SLC7A4	-5.99	-2.58	Homo sapiens solute carrier family 7, member 4 (SLC7A4), mRNA [NM_004173]
25	CEP55	-5.93	-2.57	Homo sapiens centrosomal protein 55kDa (CEP55), transcript variant 1, mRNA [NM_018131]
26	LIN7A	-5.86	-2.55	Homo sapiens lin-7 homolog A (C. elegans) (LIN7A), mRNA [NM_004664]
27	DKK1	-5.83	-2.54	Homo sapiens dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (DKK1), mRNA [NM_012242]
28	HMGB2	-5.81	-2.54	Homo sapiens high mobility group box 2 (HMGB2), transcript variant 1, mRNA [NM_002129]
29	PSG8	-5.49	-2.46	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8 (PSG8), transcript variant 1, mRNA [NM_182707]
30	CCDC85A	-5.44	-2.44	Homo sapiens coiled-coil domain containing 85A (CCDC85A), mRNA [NM_001080433]
31	NEK2	-5.43	-2.44	Homo sapiens NIMA-related kinase 2 (NEK2), transcript variant 1, mRNA [NM_002497]
32	FGF1	-5.41	-2.44	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 1, mRNA [NM_000800]
33	BRIP1	-5.38	-2.43	Homo sapiens BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1

5. RESULTADOS

				(BRIP1), mRNA [NM_032043]
34	LMNB1	-5.35	-2.42	Homo sapiens lamin B1 (LMNB1), transcript variant 1, mRNA [NM_005573]
35	UCP2	-5.28	-2.40	Homo sapiens uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (UCP2), mRNA [NM_003355]
36	E2F8	-5.26	-2.40	Homo sapiens E2F transcription factor 8 (E2F8), transcript variant 1, mRNA [NM_024680]
37	PLCE1-AS1	-5.17	-2.37	Homo sapiens PLCE1 antisense RNA 1 (PLCE1-AS1), long non-coding RNA [NR_033969]
38	ZNF331	-5.13	-2.36	zinc finger protein 331 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15489] [ENST00000509069]
39	LUZP1	-5.07	-2.34	leucine zipper protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14985] [ENST00000314174]
40	PSG8	-5.06	-2.34	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8 (PSG8), transcript variant 1, mRNA [NM_182707]
41	RTP3	-5.05	-2.34	Homo sapiens receptor (chemosensory) transporter protein 3 (RTP3), mRNA [NM_031440]
42	ANLN	-5.04	-2.33	Homo sapiens anillin, actin binding protein (ANLN), transcript variant 1, mRNA [NM_018685]
43	DEPDC1B	-5.04	-2.33	Homo sapiens DEP domain containing 1B (DEPDC1B), transcript variant 1, mRNA [NM_018369]
44	SNAR-G2	-5.04	-2.33	Homo sapiens small ILF3/NF90-associated RNA G2 (SNAR-G2), small nuclear RNA [NR_024244]
45	NPPB	-5.01	-2.33	Homo sapiens natriuretic peptide B (NPPB), mRNA [NM_002521]
46	BIRC5	-4.94	-2.30	Homo sapiens baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5), transcript variant 3, mRNA [NM_001012271]
47	TRPC4	-4.93	-2.30	Homo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 (TRPC4), transcript variant alpha, mRNA [NM_016179]
48	LZTS1	-4.91	-2.30	Homo sapiens leucine zipper, putative tumor suppressor 1 (LZTS1), mRNA [NM_021020]
49	YWHAE	-4.90	-2.29	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12851] [ENST00000576854]
50	CDCA8	-4.89	-2.29	Homo sapiens cell division cycle associated 8 (CDCA8), transcript variant 2, mRNA [NM_018101]

Tabela 8. Relação dos 50 genes com maior regulação positiva após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador CultiSpher-S®.

Up	Símbolo	FC	Log ₂ (FC)	Descrição
1	MMP3	202.30	7.66	Homo sapiens matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3), mRNA [NM_002422]
2	NPR3	85.53	6.42	Homo sapiens natriuretic peptide receptor 3 (NPR3), transcript variant 1, mRNA [NM_001204375]
3	FAM65C	70.13	6.13	Homo sapiens family with sequence similarity 65, member C (FAM65C), transcript variant 2, mRNA [NM_001290268]
4	HS3ST1	58.01	5.86	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1 (HS3ST1), mRNA [NM_005114]
5	MMP10	49.19	5.62	Homo sapiens matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2) (MMP10), mRNA [NM_002425]
6	HTRA3	48.42	5.60	Homo sapiens HtrA serine peptidase 3 (HTRA3), transcript variant 1, mRNA [NM_053044]
7	HSD11B1	45.68	5.51	Homo sapiens hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 (HSD11B1), transcript variant 2, mRNA [NM_181755]
8	NPTX1	41.10	5.36	Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1), mRNA [NM_002522]
9	MYBPH	38.56	5.27	Homo sapiens myosin binding protein H (MYBPH), mRNA [NM_004997]
10	KCND2	38.02	5.25	Homo sapiens potassium channel, voltage gated Shal related subfamily D, member 2 (KCND2), mRNA [NM_012281]
11	PF4V1	32.66	5.03	Homo sapiens platelet factor 4 variant 1 (PF4V1), mRNA [NM_002620]
12	IGFBP5	27.38	4.78	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), mRNA [NM_000599]
13	LSAMP	27.31	4.77	Homo sapiens limbic system-associated membrane protein (LSAMP), mRNA [NM_002338]
14	FDCSP	26.88	4.75	Homo sapiens follicular dendritic cell secreted protein (FDCSP), mRNA [NM_152997]
15	CXCL1	26.84	4.75	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), transcript variant 1, mRNA [NM_001511]
16	COLEC10	24.69	4.63	Homo sapiens collectin sub-family member 10 (C-type lectin) (COLEC10), mRNA [NM_006438]
17	CHRD2	24.67	4.62	chordin-like 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24168] [ENST00000376332]
18	LNX1	23.76	4.57	Homo sapiens ligand of numb-protein X 1, E3 ubiquitin protein ligase (LNX1), transcript variant 2, mRNA [NM_032622]
19	SULF2	23.44	4.55	Homo sapiens sulfatase 2 (SULF2), transcript variant 1, mRNA [NM_018837]
20	ITGB8	23.44	4.55	Homo sapiens integrin, beta 8 (ITGB8), mRNA [NM_002214]
21	NPR3	22.23	4.47	Homo sapiens natriuretic peptide receptor 3 (NPR3), transcript variant 2, mRNA [NM_000908]
22	PRL	21.53	4.43	Homo sapiens prolactin (PRL), transcript variant 1, mRNA [NM_000948]
23	IGF1	20.51	4.36	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF1), transcript variant 4, mRNA [NM_000618]
24	GPC6	19.58	4.29	Homo sapiens glypican 6 (GPC6), mRNA [NM_005708]
25	MMP1	18.50	4.21	Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1), transcript variant 1, mRNA [NM_002421]
26	COL4A6	18.49	4.21	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 6 (COL4A6), transcript variant B, mRNA [NM_033641]
27	MFAP4	18.43	4.20	Homo sapiens microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4), transcript variant 2, mRNA [NM_002404]
28	TNFRSF21	18.42	4.20	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (TNFRSF21), mRNA [NM_014452]
29	HSD17B2	18.30	4.19	Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 (HSD17B2), mRNA [NM_002153]
30	C2CD4B	17.99	4.17	Homo sapiens C2 calcium-dependent domain containing 4B (C2CD4B), mRNA [NM_001007595]
31	MAF	17.55	4.13	Homo sapiens v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (MAF), transcript variant 2, mRNA [NM_001031804]

5. RESULTADOS

32	C1S	17.35	4.12	Homo sapiens complement component 1, s subcomponent (C1S), transcript variant 2, mRNA [NM_001734]
33	CPZ	16.92	4.08	Homo sapiens carboxypeptidase Z (CPZ), transcript variant 3, mRNA [NM_001014448]
34	FBXO32	16.79	4.07	Homo sapiens F-box protein 32 (FBXO32), transcript variant 1, mRNA [NM_058229]
35	SSTR2	16.69	4.06	Homo sapiens somatostatin receptor 2 (SSTR2), mRNA [NM_001050]
36	HLA-B	16.44	4.04	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), mRNA [NM_005514]
37	ST8SIA4	15.19	3.93	Homo sapiens ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4 (ST8SIA4), transcript variant 1, mRNA [NM_005668]
38	TREM1	14.82	3.89	Homo sapiens triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1), transcript variant 1, mRNA [NM_018643]
39	CILP	14.72	3.88	Homo sapiens cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase (CILP), mRNA [NM_003613]
40	PLAT	14.70	3.88	Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA [NM_000930]
41	CHI3L2	14.59	3.87	Homo sapiens chitinase 3-like 2 (CHI3L2), transcript variant 3, mRNA [NM_001025199]
42	IL13RA2	14.57	3.86	Homo sapiens interleukin 13 receptor, alpha 2 (IL13RA2), mRNA [NM_000640]
43	G0S2	14.35	3.84	Homo sapiens G0/G1 switch 2 (G0S2), mRNA [NM_015714]
44	C3	14.32	3.84	Homo sapiens complement component 3 (C3), mRNA [NM_000064]
45	SYT4	13.74	3.78	Homo sapiens synaptotagmin IV (SYT4), mRNA [NM_020783]
46	SPINK4	13.04	3.70	Homo sapiens serine peptidase inhibitor, Kazal type 4 (SPINK4), mRNA [NM_014471]
47	DCN	12.90	3.69	Homo sapiens decorin (DCN), transcript variant A1, mRNA [NM_001920]
48	EHF	12.86	3.68	Homo sapiens ets homologous factor (EHF), transcript variant 2, mRNA [NM_012153]
49	CLU	12.70	3.67	Homo sapiens clusterin (CLU), transcript variant 1, mRNA [NM_001831]
50	COL4A6	12.55	3.65	collagen, type IV, alpha 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2208] [ENST00000461897]

Tabela 9. Relação dos 50 genes com maior regulação positiva após cultivo da CTM-CU em frasco Spinner com microcarregador MAG.

Up	Símbolo	FC	Log ₂ (FC)	Descrição
1	MMP3	152.72	7.25	Homo sapiens matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3), mRNA [NM_002422]
2	NPR3	57.16	5.84	Homo sapiens natriuretic peptide receptor 3 (NPR3), transcript variant 1, mRNA [NM_001204375]
3	MYBPH	49.85	5.64	Homo sapiens myosin binding protein H (MYBPH), mRNA [NM_004997]
4	EHF	47.07	5.56	Homo sapiens ets homologous factor (EHF), transcript variant 2, mRNA [NM_012153]
5	IL24	46.17	5.53	Homo sapiens interleukin 24 (IL24), transcript variant 3, mRNA [NM_001185156]
6	HSD11B1	45.14	5.50	Homo sapiens hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 (HSD11B1), transcript variant 2, mRNA [NM_181755]
7	MMP10	43.88	5.46	Homo sapiens matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2) (MMP10), mRNA [NM_002425]
8	FAM65C	37.48	5.23	Homo sapiens family with sequence similarity 65, member C (FAM65C), transcript variant 2, mRNA [NM_001290268]
9	IGFBP5	33.06	5.05	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), mRNA [NM_000599]
10	CDCP1	31.85	4.99	Homo sapiens CUB domain containing protein 1 (CDCP1), transcript variant 1, mRNA [NM_022842]
11	NPTX1	30.29	4.92	Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1), mRNA [NM_002522]
12	SPINK4	28.06	4.81	Homo sapiens serine peptidase inhibitor, Kazal type 4 (SPINK4), mRNA [NM_014471]
13	HS3ST1	27.48	4.78	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1 (HS3ST1), mRNA [NM_005114]
14	MMP1	25.61	4.68	Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1), transcript variant 1, mRNA [NM_002421]
15	SERPINB3	25.47	4.67	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3 (SERPINB3), mRNA [NM_006919]
16	PLAT	24.83	4.63	Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA [NM_000930]
17	TNXB	22.44	4.49	Homo sapiens tenascin XB (TNXB), transcript variant XB-S, mRNA [NM_032470]
18	THBD	21.08	4.40	Homo sapiens thrombomodulin (THBD), mRNA [NM_000361]
19	IGF1	20.04	4.32	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF1), transcript variant 4, mRNA [NM_000618]
20	HTRA3	18.90	4.24	Homo sapiens HtrA serine peptidase 3 (HTRA3), transcript variant 1, mRNA [NM_053044]
21	NPR3	18.48	4.21	Homo sapiens natriuretic peptide receptor 3 (NPR3), transcript variant 2, mRNA [NM_000908]
22	SLC7A2	17.99	4.17	Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2 (SLC7A2), transcript variant 2, mRNA [NM_001008539]
23	ST6GAL2	17.57	4.13	Homo sapiens ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 (ST6GAL2), transcript variant 1, mRNA [NM_032528]
24	SERPINB4	17.43	4.12	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4 (SERPINB4), transcript variant 1, mRNA [NM_002974]
25	CXCL1	16.13	4.01	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), transcript variant 1, mRNA [NM_001511]
26	CELA2A	15.54	3.96	Homo sapiens chymotrypsin-like elastase family, member 2A (CELA2A), mRNA [NM_033440]
27	TREM1	15.39	3.94	Homo sapiens triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1), transcript variant 1, mRNA [NM_018643]
28	CNIH3	14.73	3.88	Homo sapiens comichon family AMPA receptor auxiliary protein 3 (CNIH3), mRNA [NM_152495]
29	COLEC10	14.57	3.86	Homo sapiens collectin sub-family member 10 (C-type lectin) (COLEC10), mRNA [NM_006438]
30	FDCSP	14.46	3.85	Homo sapiens follicular dendritic cell secreted protein (FDCSP),

5. RESULTADOS

				mRNA [NM_152997]
31	PF4V1	13.76	3.78	Homo sapiens platelet factor 4 variant 1 (PF4V1), mRNA [NM_002620]
32	GPC6	13.60	3.77	Homo sapiens glypican 6 (GPC6), mRNA [NM_005708]
33	KCND2	13.01	3.70	Homo sapiens potassium channel, voltage gated Shal related subfamily D, member 2 (KCND2), mRNA [NM_012281]
34	HSD17B2	12.60	3.66	Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 (HSD17B2), mRNA [NM_002153]
35	FAM167A	12.51	3.65	Homo sapiens family with sequence similarity 167, member A (FAM167A), mRNA [NM_053279]
36	HLA-B	11.92	3.57	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), mRNA [NM_005514]
37	SLC22A3	11.13	3.48	Homo sapiens cDNA FLJ39661 fis, clone SMINT2007101, [AK096980]
38	ACKR4	11.02	3.46	Homo sapiens atypical chemokine receptor 4 (ACKR4), transcript variant 1, mRNA [NM_178445]
39	COL4A6	10.83	3.44	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 6 (COL4A6), transcript variant B, mRNA [NM_033641]
40	PAPPA	10.70	3.42	Homo sapiens pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1 (PAPPA), mRNA [NM_002581]
41	SVIL	10.62	3.41	Homo sapiens supervillin (SVIL), transcript variant 2, mRNA [NM_021738]
42	MTSS1	10.56	3.40	Homo sapiens metastasis suppressor 1 (MTSS1), transcript variant 2, mRNA [NM_014751]
43	ST8SIA4	10.49	3.39	Homo sapiens ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4 (ST8SIA4), transcript variant 1, mRNA [NM_005668]
44	LNX1	10.33	3.37	Homo sapiens ligand of numb-protein X 1, E3 ubiquitin protein ligase (LNX1), transcript variant 2, mRNA [NM_032622]
45	HSPB3	10.05	3.33	Homo sapiens heat shock 27kDa protein 3 (HSPB3), mRNA [NM_006308]
46	HTRA1	10.03	3.33	Homo sapiens HtrA serine peptidase 1 (HTRA1), mRNA [NM_002775]
47	CD82	9.99	3.32	Homo sapiens CD82 molecule (CD82), transcript variant 1, mRNA [NM_002231]
48	TFPI2	9.92	3.31	Homo sapiens tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2), transcript variant 1, mRNA [NM_006528]
49	PTGS2	9.88	3.30	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS2), mRNA [NM_000963]
50	HLA-B	9.58	3.26	major histocompatibility complex, class I, B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4932] [ENST00000466304]

Tabela 10. Relação dos 50 genes com maior regulação positiva após cultivo da CTM-CU no Biorreator Wave™ com microcarregador CultiSpher-S®.

Up	Símbolo	FC	Log ₂ (FC)	Descrição
1	TNXB	78.44	6.29	Homo sapiens tenascin XB (TNXB), transcript variant XB-S, mRNA [NM_032470]
2	MMP3	47.30	5.56	Homo sapiens matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3), mRNA [NM_002422]
3	HS3ST1	29.82	4.90	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1 (HS3ST1), mRNA [NM_005114]
4	PLAT	27.59	4.79	Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA [NM_000930]
5	MYBPH	24.06	4.59	Homo sapiens myosin binding protein H (MYBPH), mRNA [NM_004997]
6	CNIH3	21.81	4.45	Homo sapiens comichon family AMPA receptor auxiliary protein 3 (CNIH3), mRNA [NM_152495]
7	MTSS1	21.57	4.43	Homo sapiens metastasis suppressor 1 (MTSS1), transcript variant 2, mRNA [NM_014751]
8	CDCP1	16.11	4.01	Homo sapiens CUB domain containing protein 1 (CDCP1), transcript variant 1, mRNA [NM_022842]
9	SVIL	15.85	3.99	Homo sapiens supervillin (SVIL), transcript variant 2, mRNA [NM_021738]
10	FAM65C	15.46	3.95	Homo sapiens family with sequence similarity 65, member C (FAM65C), transcript variant 2, mRNA [NM_001290268]
11	SPINK4	14.92	3.90	Homo sapiens serine peptidase inhibitor, Kazal type 4 (SPINK4), mRNA [NM_014471]
12	FDCSP	14.68	3.88	Homo sapiens follicular dendritic cell secreted protein (FDCSP), mRNA [NM_152997]
13	HSPB3	14.59	3.87	Homo sapiens heat shock 27kDa protein 3 (HSPB3), mRNA [NM_006308]
14	HSD11B1	14.45	3.85	Homo sapiens hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 (HSD11B1), transcript variant 2, mRNA [NM_181755]
15	CHAC1	14.29	3.84	Homo sapiens ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1 (CHAC1), transcript variant 1, mRNA [NM_024111]
16	EHF	14.26	3.83	Homo sapiens ets homologous factor (EHF), transcript variant 2, mRNA [NM_012153]
17	CELA2A	13.52	3.76	Homo sapiens chymotrypsin-like elastase family, member 2A (CELA2A), mRNA [NM_033440]
18	THBD	12.71	3.67	Homo sapiens thrombomodulin (THBD), mRNA [NM_000361]
19	IGF1	12.15	3.60	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF1), transcript variant 4, mRNA [NM_000618]
20	COLEC10	11.92	3.58	Homo sapiens collectin sub-family member 10 (C-type lectin) (COLEC10), mRNA [NM_006438]
21	TREM1	11.73	3.55	Homo sapiens triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1), transcript variant 1, mRNA [NM_018643]
22	VLDLR	11.61	3.54	Homo sapiens very low density lipoprotein receptor (VLDLR), transcript variant 1, mRNA [NM_003383]
23	ASNS	11.44	3.52	Homo sapiens asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing) (ASNS), transcript variant 2, mRNA [NM_001673]
24	IL13RA2	11.33	3.50	Homo sapiens interleukin 13 receptor, alpha 2 (IL13RA2), mRNA [NM_000640]
25	ADM2	11.12	3.48	Homo sapiens adrenomedullin 2 (ADM2), transcript variant 1, mRNA [NM_024866]
26	GDF15	10.95	3.45	Homo sapiens growth differentiation factor 15 (GDF15), mRNA [NM_004864]
27	AKR1B10	10.87	3.44	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10), mRNA [NM_020299]
28	AKR1B10	10.52	3.39	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10), mRNA [NM_020299]
29	SYNDIG1	9.96	3.32	Homo sapiens synapse differentiation inducing 1 (SYNDIG1), mRNA [NM_024893]
30	MGP	9.76	3.29	Homo sapiens matrix Gla protein (MGP), transcript variant 1, mRNA [NM_001190839]
31	HTRA1	9.54	3.25	Homo sapiens HtrA serine peptidase 1 (HTRA1), mRNA [NM_002775]

5. RESULTADOS

32	CXCL1	9.27	3.21	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), transcript variant 1, mRNA [NM_001511]
33	ST6GAL2	9.19	3.20	Homo sapiens ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 (ST6GAL2), transcript variant 1, mRNA [NM_032528]
34	KIAA1644	9.04	3.18	Homo sapiens KIAA1644 (KIAA1644), mRNA [NM_001099294]
35	CHAC1	8.85	3.15	Homo sapiens ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1 (CHAC1), transcript variant 1, mRNA [NM_024111]
36	STEAP1	8.75	3.13	Homo sapiens six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 (STEAP1), mRNA [NM_012449]
37	MMP1	8.45	3.08	Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1), transcript variant 1, mRNA [NM_002421]
38	ASS1	8.27	3.05	Homo sapiens argininosuccinate synthase 1 (ASS1), transcript variant 1, mRNA [NM_000050]
39	SLC7A2	8.24	3.04	Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2 (SLC7A2), transcript variant 2, mRNA [NM_001008539]
40	NUPR1	7.91	2.98	Homo sapiens nuclear protein, transcriptional regulator, 1 (NUPR1), transcript variant 1, mRNA [NM_001042483]
41	SGCG	7.82	2.97	Homo sapiens sarco glycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein) (SGCG), mRNA [NM_000231]
42	SPRY1	7.78	2.96	Homo sapiens sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila) (SPRY1), transcript variant 2, mRNA [NM_199327]
43	PMCH	7.65	2.94	Homo sapiens pro-melanin-concentrating hormone (PMCH), mRNA [NM_002674]
44	RASSF2	7.63	2.93	Homo sapiens Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2 (RASSF2), transcript variant 1, mRNA [NM_014737]
45	CRLF1	7.62	2.93	Homo sapiens cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1), mRNA [NM_004750]
46	HTR2B	7.51	2.91	Homo sapiens 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B, G protein-coupled (HTR2B), mRNA [NM_000867]
47	PLA2G4C	7.44	2.89	Homo sapiens phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent) (PLA2G4C), transcript variant 1, mRNA [NM_003706]
48	SORBS2	7.22	2.85	Homo sapiens sorbin and SH3 domain containing 2 (SORBS2), transcript variant 2, mRNA [NM_021069]
49	IGFBP5	7.15	2.84	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), mRNA [NM_000599]
50	CSTA	7.10	2.83	Homo sapiens cystatin A (stefin A) (CSTA), mRNA [NM_005213]

5.8. Vesículas extracelulares coletadas do meio condicionado derivado da CTM-CU nos cultivos em Biorreator Wave™ e frasco Spinner

A Figura 59 apresenta a distribuição de diâmetros das vesículas extracelulares coletadas ao término dos cultivos $W_{\text{mod}3\text{CS}}$, $W_{\text{mod}4\text{CS}}$, $S1_{\text{MAG}}$, $S2_{\text{MAG}}$, $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$ e também das vesículas extracelulares coletadas em cultivo da CTM-CU em frasco de cultura (2D, modo estático). Entre os cultivos analisados, os cultivos em 3D, $W_{\text{mod}3\text{CS}}$, $W_{\text{mod}4\text{CS}}$, $S_{\text{MAG}1}$, $S_{\text{MAG}2}$, $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, se destacam pela maior concentração de vesículas extracelulares coletadas do sobrenadante dos reatores ao término da operação, quando comparados à concentração de VEs coletadas em cultivo 2D-estático.

A maior produção de VEs em culturas 3D foi relatada em estudo de Haraszti e colaboradores (2018), onde obtiveram do sobrenadante coletado de cultura da CTM-CU em frasco spinner, uma razão entre o número de exossomos (diâmetro entre 40-150 nm) por célula 140 vezes maior no cultivo da CTM-CU em 3D quando comparado ao cultivo 2D (HARASZTI et al., 2018). Em outro estudo, Cha e colaboradores (2018) apresentaram produção de VEs por célula 100 vezes maior em cultivo de CTMs em esferóides comparado ao cultivo 2D.

Apesar do menor fator de expansão celular dentre os cultivos analisados, os cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$ apresentaram a maior estimativa da razão entre número de vesículas extracelulares coletadas por número de células ao término do cultivo, sendo de 4,87 e 4,37 x 10⁵ VEs/cel para o $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, respectivamente. Destas, obteve-se respectivamente 9,04 e 7,07 x 10⁴ VEs/cel (18,6 e 16,2 % do total), com diâmetro entre 40-150 nm, diâmetros que caracterizam exossomos. Esse percentual de partículas coletadas com diâmetro na faixa dos exossomos foi o menor dentre os cultivos analisados (Figura 60).

Nos cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, o maior percentual de VEs se encontrou na faixa entre 150 e 450 nm, representando, respectivamente, 76,2 e 73,8% do total de VEs. Os cultivos $S1_{\text{MAG}}$ e $S2_{\text{MAG}}$ apresentaram, respectivamente, 1,34 e 0,61 x 10⁴ VEs/cel com diâmetro entre 40-150 nm. Esses valores representaram 42,1 e 32,7% do total de partículas coletadas, respectivamente. Para essa faixa de diâmetro de partículas, no cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ obteve-se 2,94 x 10⁴ VEs/cel, representando 23,1 % do total de VEs. No cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$ obteve-se 3,15 x 10⁴ VEs/cel, representando 41,2 % do total de VEs.

Figura 59. Distribuição de diâmetros das vesículas extracelulares coletadas ao término dos cultivos $W_{\text{mod}3\text{CS}}$, $W_{\text{mod}4\text{CS}}$, $S1_{\text{MAG}}$, $S2_{\text{MAG}}$, $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$ e em cultivo da CTM-CU em modo 2D-estático.

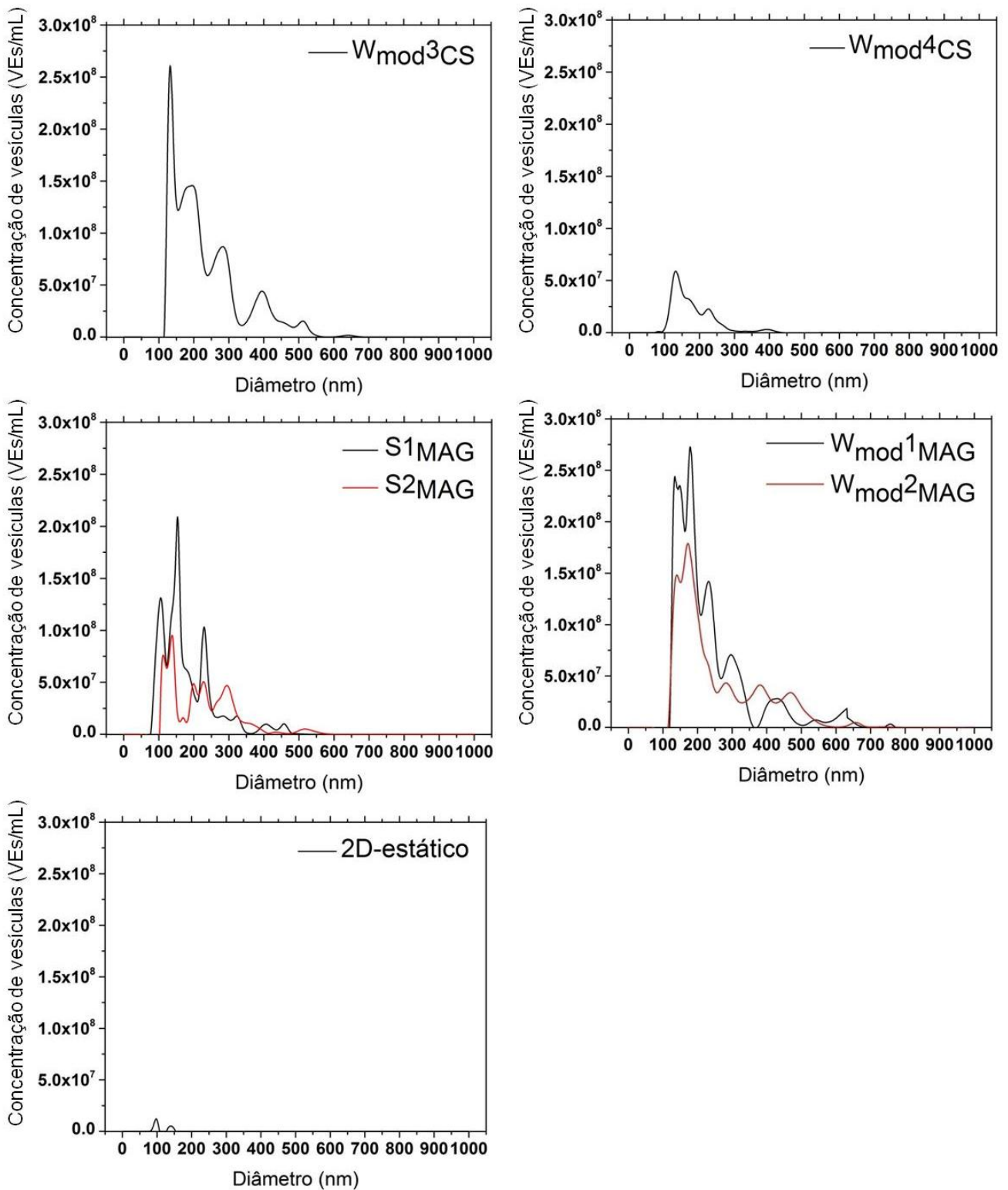
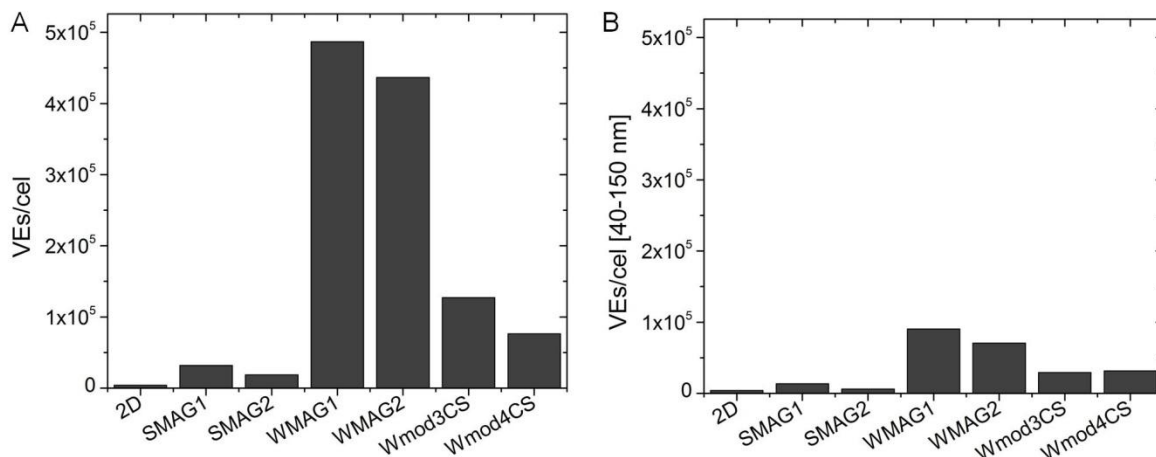


Figura 60. (A) Estimativa do número de vesículas extracelulares coletadas (0-1000 nm) por número de células ao término dos cultivos $S1_{MAG}$, $S2_{MAG}$, $W_{mod1MAG}$, $W_{mod2MAG}$, W_{mod3CS} e W_{mod4CS} , e em cultivo da CTM-CU em modo 2D-estático. (B) Estimativa do número de exossomos coletados (40-150 nm) por número de células ao término dos cultivos $S1_{MAG}$, $S2_{MAG}$, $W_{mod1MAG}$, $W_{mod2MAG}$, W_{mod3CS} e W_{mod4CS} e em cultivo da CTM-CU em modo 2D-estático.



O maior percentual de VEs com diâmetro entre 40-150 nm foi obtido no sobrenadante do cultivo da CTM-CU em 2D, o qual apresentou $0,39 \times 10^4$ VEs/cel, representando 97,3 % do total de vesículas extracelulares coletadas.

O número e o conteúdo das vesículas extracelulares liberadas pelas CTMs estão intimamente ligados às condições do ambiente onde as células se encontram (LIN; DU, 2018; MONSEL et al., 2017). Nos cultivos $W_{mod1MAG}$ e $W_{mod2MAG}$ a frequência e intensidade dos depósitos de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag (região de borda líquido-gás) foram maiores quando comparados aos cultivos W_{mod3CS} e W_{mod4CS} e, logicamente, inexistentes nos cultivos em frasco spinner ($S1_{MAG}$ e $S2_{MAG}$) e em 2D. Esse processo pode ter provocado uma condição de estresse nas CTM-CU, induzindo a maior liberação de VEs.

6. DISCUSSÃO

6.1. Problemas enfrentados no cultivo da CTM-CU em biorreator com movimento ondulatório - Depósitos de Microcarregadores na Cellbag

O biorreator com movimento ondulatório se mostrou efetivo no cultivo de células em suspensão, como células CHO (CLINCKE et al., 2013) e células S2 (DECARLI et al., 2018). Esse modelo de biorreator também se mostrou efetivo para o cultivo de células Vero ancoradas no microcarregador Cytodex 1[®], apresentando nível de crescimento e comportamento metabólico semelhante ao obtido em biorreator de tanque agitado (THOMASSEN et al., 2012). Contudo, no cultivo de CTMs, o biorreator com movimento ondulatório apresenta problemas operacionais ligados principalmente à deposição de microcarregadores no filme interno da Cellbag.

O cultivo da CTM-CU no biorreator com movimento ondulatório utilizando a Cellbag em posição normal de operação, conforme é recomendada pelos fabricantes, foi prejudicado pelos sucessivos depósitos de microcarregadores no plástico da Cellbag, obtendo-se fatores de expansão de apenas 2 vezes. Neste trabalho, foi identificado que devido ao movimento unidirecional da plataforma, ocorrem dois tipos de depósitos de partículas:

1. Deposição de partículas na superfície inferior das extremidades da Cellbag, caracterizados como depósitos “tipo duna”;
2. Deposição de partículas na superfície lateral da Cellbag, na região de borda líquido-gás.

Através da análise do filme interno da Cellbag, pelos métodos de ângulo de contato e MFA, foi verificado que o filme interno da Cellbag antes de ser empregada em cultivo (Cellbag nova) era hidrofóbico e apresentava superfície rugosa. A análise do filme interno de uma Cellbag após cultivo da CTM-CU mostrou que a superfície interna tornou-se hidrofílica e com rugosidade superficial menor que na condição anterior ao cultivo. Tal fato sugere que pode ter ocorrido deposição de compostos presentes no meio de cultivo (como proteínas e lipídeos) nas irregularidades da superfície do filme interno. Tomando como base compostos com região hidrofóbica e hidrofílica, a região hidrofóbica interagiu com o filme da Cellbag e a região hidrofílica ficou exposta ao meio de cultivo, elevando a hidrofilicidade do filme interno da Cellbag.

Esse fato foi comprovado através da análise de amostras do filme interno da Cellbag após tratamento com tripsina-EDTA 0,25%. As amostras após tratamento com tripsina apresentaram aumento da rugosidade do filme interno para valores semelhantes ao de uma Cellbag nova e recuperação parcial do caráter hidrofóbico. Esse fato sugere que proteínas suscetíveis à ação da tripsina foram removidas do filme, enquanto outros compostos permaneceram adsorvidos, como proteínas não suscetíveis à tripsina e lipídeos. O aumento da molhabilidade (hidrofilicidade) do filme interno favoreceu a retenção dos microcarregadores na Cellbag, provocando a formação dos depósitos de microcarregadores.

Para viabilizar o cultivo da CTM-CU em biorreator com movimento ondulatório é necessário contornar o problema dos depósitos de microcarregadores na Cellbag. Visando resolver esse problema, nesta tese foi desenvolvido o suporte de acrílico com laterais inclinadas em 80°(descrito no item 4.5., Material e Métodos), para ser colocado sobre a plataforma de agitação. A Cellbag era acomodada dentro desse suporte, sendo encurtada longitudinalmente, para elevar as suas laterais. Nesse novo formato da Cellbag, os depósitos de microcarregadores “tipo duna” não foram observados, uma vez que com a elevação das laterais, os microcarregadores conduzidos pelo movimento unidirecional da plataforma para as regiões longitudinais extremas retornam para o líquido.

O segundo tipo de depósito, formado ao longo das paredes da Cellbag, na região de borda líquido-gás, embora de intensidade menor, permaneceu ocorrendo nos cultivos realizados com a Cellbag no novo formato. A inibição desse tipo de depósito está intimamente relacionada ao desenvolvimento de uma película para o filme interno da Cellbag que seja inerte ao cultivo, permanecendo com caráter hidrofóbico.

Uma situação que pode ilustrar bem a probabilidade de sucesso do desenvolvimento de uma película hidrofóbica para o filme interno da Cellbag, é o fato rotineiro em nossos laboratórios ao cultivar CTMs em frascos spinner de vidro. Para superfícies como vidro, por exemplo, existem produtos que desempenham o papel de formar películas hidrofóbicas. Neste trabalho, a superfície interna do frasco spinner antes dos cultivos foi recoberta por Sigmacote[®], o qual formava uma película hidrofóbica no vidro interno, inibindo a deposição de microcarregadores e células.

6.2. Perfil de crescimento da CTM-CU e Fatores de Expansão Celular

Com o formato da Cellbag modificado, foram avaliadas duas abordagens de cultivo da CTM-CU no Biorreator Wave™:

1. Fase de adesão das células aos microcarregadores em frasco spinner e fase de expansão no Biorreator Wave™ (Spinner-Wave_{mod});
2. Fase de adesão das células aos microcarregadores e fase de expansão no Biorreator Wave™ (Wave_{mod}).

Os cultivos Spinner-Wave_{mod} foram realizados com o microcarregador comercial CultiSpher-S®. Foram realizados cultivos Wave_{mod} com o microcarregador CultiSpher-S® e com o microcarregador MAG (desenvolvido no LATECC).

O conjunto de cultivos realizados no sistema Spinner-Wave_{mod} apresentou bons resultados de expansão da CTM-CU. Considerando o número máximo de células e o número inicial de células aderidas aos microcarregadores, obtidos pelo método MTT, o FE foi de $7,3 \pm 1,1$. Nos cultivos Wave_{mod} com o microcarregador CultiSpher-S® obteve-se FE de 11,6 (Wave_{mod1CS}, 240 h), 25,6 (Wave_{mod2CS}, 240 h), 24,8 (Wave_{mod3CS}, 264 h) e 6,3 (Wave_{mod4CS}, 312 h).

A maior expansão registrada para o Wave_{mod2CS} e Wave_{mod3CS}, quando comparados ao Wave_{mod1CS}, pode ser relacionada a dois fatores: 1) menor volume inicial aplicado na fase de adesão, o qual reduz a área de superfície molhada e evita a perda de células por sedimentação sobre o plástico da Cellbag, melhorando o nível de adesão das células aos microcarregadores; 2) manutenção da Cellbag em condição estática durante as primeiras 24 h, possibilitando melhor fixação e distribuição das células aos microcarregadores (JOSSEN et al., 2016; RAFIQ et al., 2013, 2016).

A menor expansão obtida nos cultivos no sistema Spinner-Wave_{mod} comparada aos cultivos Wave_{mod} com melhor desempenho, pode estar relacionada à mudança de plataforma de cultivo (transferência das CTM-CU do frasco spinner para o Biorreator Wave™) o que pode ter gerado uma condição de estresse devido à necessidade de adaptação das células à hidrodinâmica do Biorreator Wave™.

A relação do número de CTM-CU inoculadas por microcarregador nos cultivos Wave_{mod2CS}, Wave_{mod3CS}, e Wave_{mod4CS} foi de 30, 16 e 6 células/MC, respectivamente. Assim, percebe-se que a relação de 6 células/MC empregada no Wave_{mod4CS} gerou uma fase lag longa. A velocidade específica de crescimento e o fator de expansão foram cerca de 3 e 4 vezes menores, respectivamente, que os valores obtidos nos cultivos Wave_{mod2CS} e Wave_{mod3CS}. Considerando a eficiência de adesão obtida no Wave_{mod2CS}, Wave_{mod3CS}, e Wave_{mod4CS}, a relação de células/MC com 24 h foi de 18,2, 12,9 e 4,9 cel/MC, respectivamente. Assim, para inóculos com concentração inicial em

torno de $1,0 \times 10^4$ cel/mL, a relação ideal para o número de células inoculadas por microcarregador deve ficar entre 30 e 16 células por microcarregador.

Nos cultivos $Wave_{mod}$ com o microcarregador MAG, obteve-se fator de expansão celular de 5,9 ($Wave_{mod1MAG}$, 288 h) e 5,1 ($Wave_{mod2MAG}$, 216 h). O crescimento menor nesses cultivos pode estar ligado à maior incidência de depósitos de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag. O MAG apresenta propriedades estruturais (matriz formada por colágeno e gelatina) que o tornam mais propenso a aderir em superfícies hidrofílicas, o que pode ter influenciado os frequentes depósitos no plástico da Cellbag. O $Wave_{mod2MAG}$ apresentou depósito do microcarregador MAG nível 2 a partir de 144 h, sendo registrado até o término da operação, com 312 h.

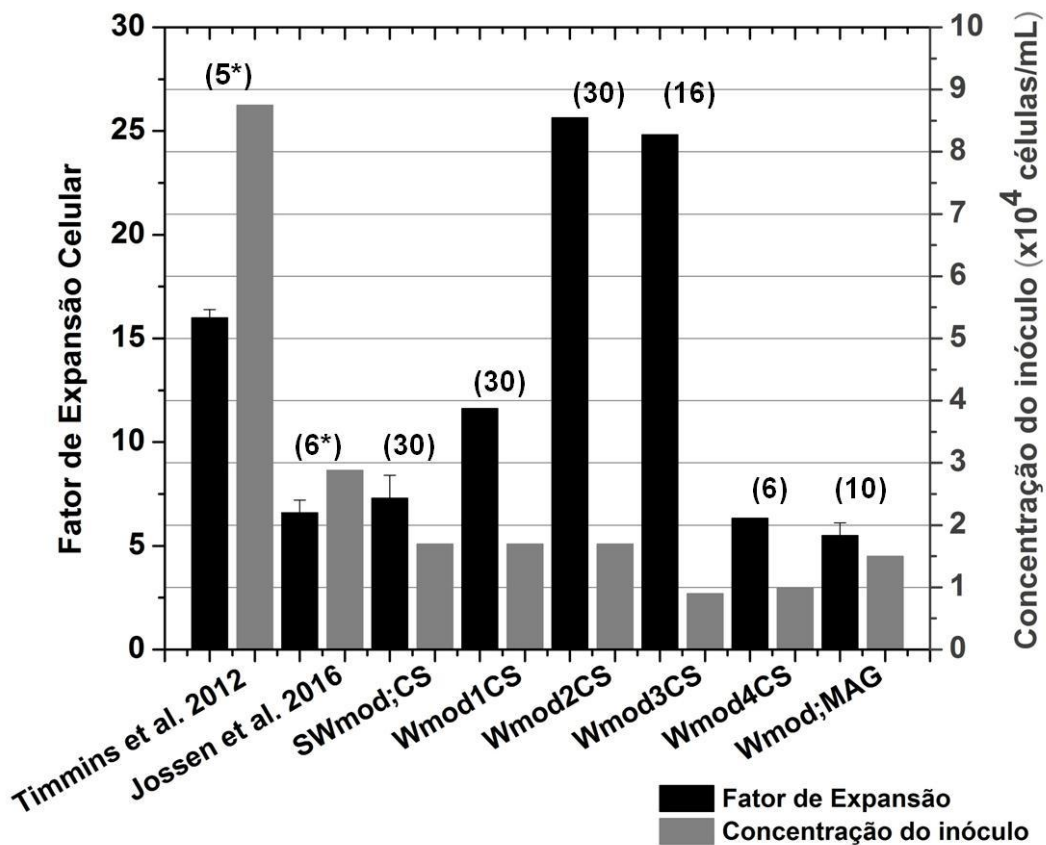
Foram realizados cultivos controle em frasco spinner, em condição de inóculo e concentração de microcarregadores semelhantes às utilizadas nos cultivos Spinner- $Wave_{mod}$ e $Wave_{mod}$, com os microcarregadores CultiSpher-S® e MAG. O fator de expansão celular verificado nos cultivos da CTM-CU em frasco spinner com o microcarregador CultiSpher-S® foi de $54,7 \pm 1,7$ em 7 dias de cultivo. Utilizando o microcarregador MAG, obteve-se fator de expansão de $49,8 \pm 2,8$ em 11 dias de cultivo.

Na Figura 61 estão apresentados os fatores de expansão celular obtidos nos únicos dois artigos publicados até o momento sobre cultivo da CTM em biorreator com movimento ondulatório e os fatores de expansão celular obtidos nesta tese, nos cultivos Spinner- $Wave_{mod}$ e $Wave_{mod}$. Conforme verificado na Figura 61, os fatores de expansão celular obtidos neste trabalho no sistema Spinner- $Wave_{mod}$ e nos cultivos $Wave_{mod1CS}$, $Wave_{mod4CS}$ e $Wave_{modMAG}$ foram semelhantes aos reportados por Jossen e colaboradores (2016) para CTM proveniente de tecido adiposo, obtendo FE de $6,6 \pm 0,6$ em 9 dias de cultivo (JOSSEN et al., 2016). Esses cultivos citados ficaram abaixo do fator de expansão apresentado por Timmins e colaboradores (2012), com FE de $16,0 \pm 0,4$ em 7 dias, utilizando CTM proveniente do tecido de placenta (TIMMINS et al., 2012).

Jossen e colaboradores (2016) realizaram a fase de adesão das células aos microcarregadores em frasco schott, dentro de shaker para controle da agitação e atmosfera de trabalho. Já Timmins e colaboradores (2012) realizaram a fase de adesão na Cellbag. Contudo, é importante ressaltar que Timmins e colaboradores (2012) trabalharam com concentração inicial do inóculo próxima a 9×10^4 cel/mL, e somente conseguiram a expansão de 16 vezes quando operaram em hipóxia. Igualmente importante apresentar que Jossen e colaboradores (2016) realizaram o cultivo com inóculo próximo a 3×10^4 cel/mL, com concentração de microcarregador estimada em 11,3 g/L, cerca de 16 vezes a concentração de microcarregador aplicada

nos cultivos Spinner-Wave_{mod}. Pensando na operação da Cellbag em posição normal, o uso de inóculo maior e concentração alta de microcarregador, como no caso dos artigos apresentados, pode ter sido a alternativa encontrada para reduzir o impacto da perda de células ocorrida pelos depósitos de microcarregadores no plástico, já que o número de células aderidas vai estar distribuído em um maior número de microcarregadores.

Figura 61. Fatores de expansão celular e concentração do inóculo obtidos na literatura sobre cultivo de CTM em biorreator com movimento ondulatório, e fatores de expansão celular e concentração do inóculo nos cultivos da CTM-CU no Biorreator WaveTM com o formato da Cellbag modificado (Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}). Não foi observada diferença estatística entre os cultivos Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} ($p > 0,05$). Relação do número de células inoculadas por microcarregador apresentada entre parênteses (cel/MC). (cel/MC*): valores estimados.

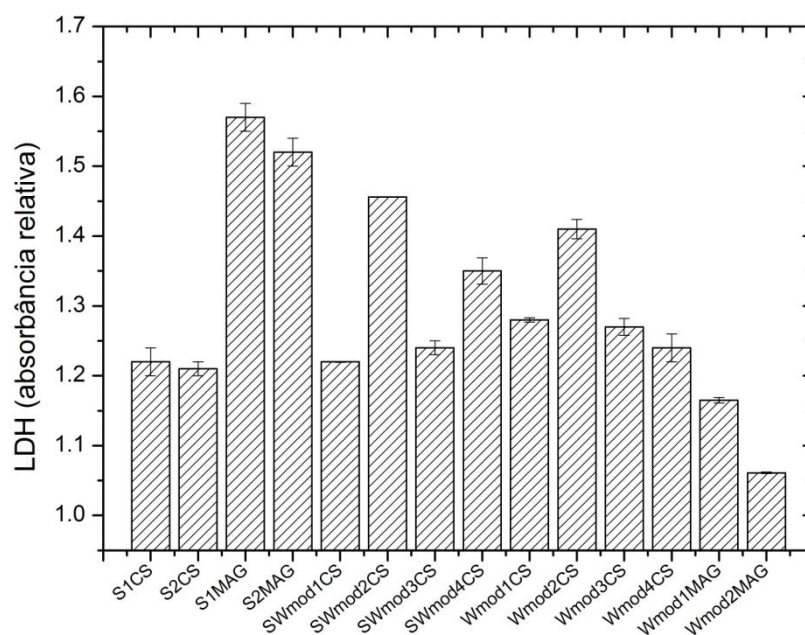


Os fatores de expansão celular registrados nos cultivos Wave_{mod}2_{MAG} e Wave_{mod}3_{MAG} superaram o apresentado por Timmins e colaboradores (2012), mesmo operando com inóculo baixo e em normóxia. O conjunto dos resultados Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} mostraram que a operação no Biorreator WaveTM com o formato da Cellbag modificado, através do uso do suporte, possibilitou expansão adequada da CTM-CU.

Quando comparados aos cultivos em frasco spinner, os cultivos Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} apresentaram, em geral, fase lag mais longa e velocidade específica de crescimento menor. Conforme verificado na Figura 62, o nível de LDH relativo ($LDH/LDH_{inicial}$) presente na suspensão dos cultivos Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} apresentaram, com exceção dos cultivos SW_{mod2CS}, SW_{mod4CS}, W_{mod2CS} e W_{modMAG}, valores máximos próximos aos verificados nos cultivos em spinner com Cultispher-S[®] (S_{CS}). Os cultivos W_{modMAG}, apesar dos depósitos mais frequentes de microcarregadores, apresentaram nível de LDH inferior ao registrado nos cultivos S_{CS}. Já os cultivos SW_{mod2CS}, SW_{mod4CS} e W_{mod2CS}, registraram nível de LDH superior ao registrado nos cultivos S_{CS}, indicando maior morte celular.

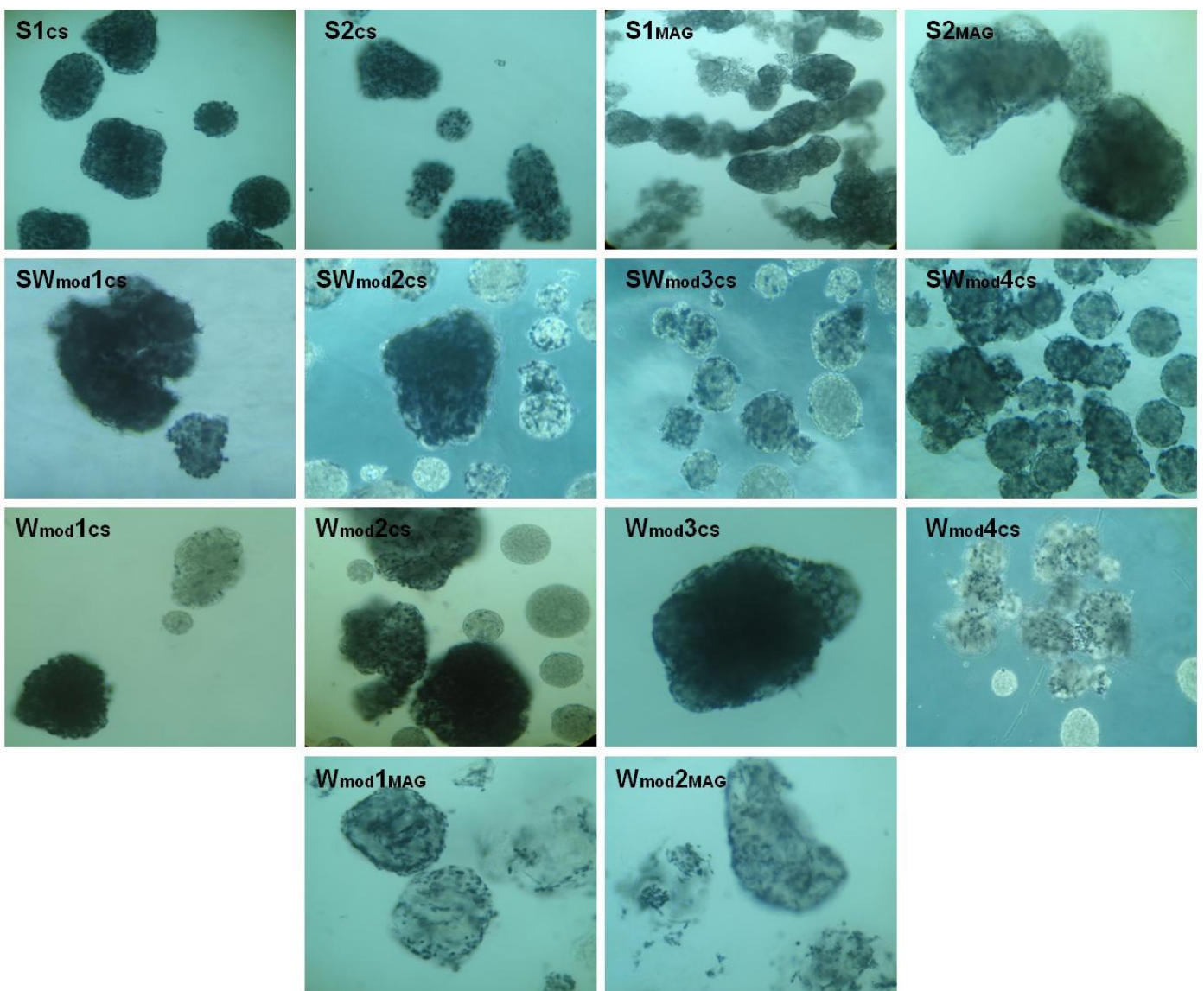
Os cultivos em spinner com o microcarregador MAG (S_{MAG}) apresentaram LDH relativo acima de 1,5, os maiores níveis registrados dentre todos os cultivos. Esse fato pode estar ligado ao maior nível de agregação dos microcarregadores nesses cultivos. Além disso, por serem partículas de matriz à base de espuma, os microcarregadores MAG se mostraram mais frágeis que os microcarregadores Cultispher-S[®]. A matriz menos rígida do MAG pode ter deixado as células mais vulneráveis às forças externas (LEE et al., 2014; SART et al., 2016). A tensão de cisalhamento e os choques entre partículas de MAG durante o cultivo no spinner podem ter gerado maior desadesão das células localizadas na superfície dos microcarregadores, provocando a morte dessas células.

Figura 62. Nível máximo de LDH relativo ($LDH/LDH_{inicial}$) presente no meio de cultivo obtido nos cultivos da CTM-CU realizados em frasco Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}.



A Figura 63 apresenta imagens dos microcarregadores após aplicação do método MTT, evidenciando a formação dos cristais de formazan nas células ativas, ao término dos cultivos realizados. Nos cultivos Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} pode-se verificar a presença de agregados de microcarregadores ocupados por células e microcarregadores com poucas ou nenhuma célula. Os microcarregadores com baixa ocupação podem estar relacionados à adesão dos mesmos na superfície lateral da Cellbag, na região de borda líquido-gás.

Figura 63. Imagens dos microcarregadores após aplicação do método MTT evidenciando a presença da CTM-CU aderida aos microcarregadores através da formação dos cristais de formazan (regiões escuras sobre os microcarregadores), ao término dos cultivos Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}. Magnificação: 100x para todas as imagens, exceto para S2_{MAG} e W_{mod}3_{CS}, com 200x.



No caso dos microcarregadores CultiSpher-S[®], esses depósitos tendem a ser mais intensos quanto maior o crescimento e agregação, havendo maior presença de matriz extracelular na superfície das partículas (microcarregadores/agregados de microcarregadores). Assim, durante o processo de agitação do fluido, as partículas apresentam maior tendência de adesão ao plástico ao se chocarem nas laterais da Cellbag, não retornando para o líquido. Com relação ao cultivo Wave_{mod1}MAG, os depósitos de nível 3 estão relacionados também à característica superficial do MAG, com maior propensão em aderir às superfícies hidrofílicas, conforme relatado anteriormente.

Esses depósitos de microcarregadores, ainda que em menor intensidade devido ao novo formato de operação da Cellbag, permaneceram ocorrendo, provocando morte das células aderidas nos microcarregadores depositados no plástico. Nos procedimentos diários de amostragem, esses microcarregadores são reinseridos no meio de cultivo e permanecem com poucas ou nenhuma célula aderida. Tal fato pode ser explicado pelo movimento unidirecional da plataforma, o qual não induz a colisão entre partículas na intensidade que ocorre em frasco spinner, por exemplo, reduzindo a possibilidade de transferência de células de microcarregadores com maior densidade celular para microcarregadores com menor densidade celular. Contudo, estudos com foco na transferência de células entre microcarregadores em biorreator com movimento ondulatório ainda precisam ser realizados a fim de detalhar adequadamente esse fenômeno (ÅKERSTRÖM, 2009).

6.3. Metabolismo da CTM-CU

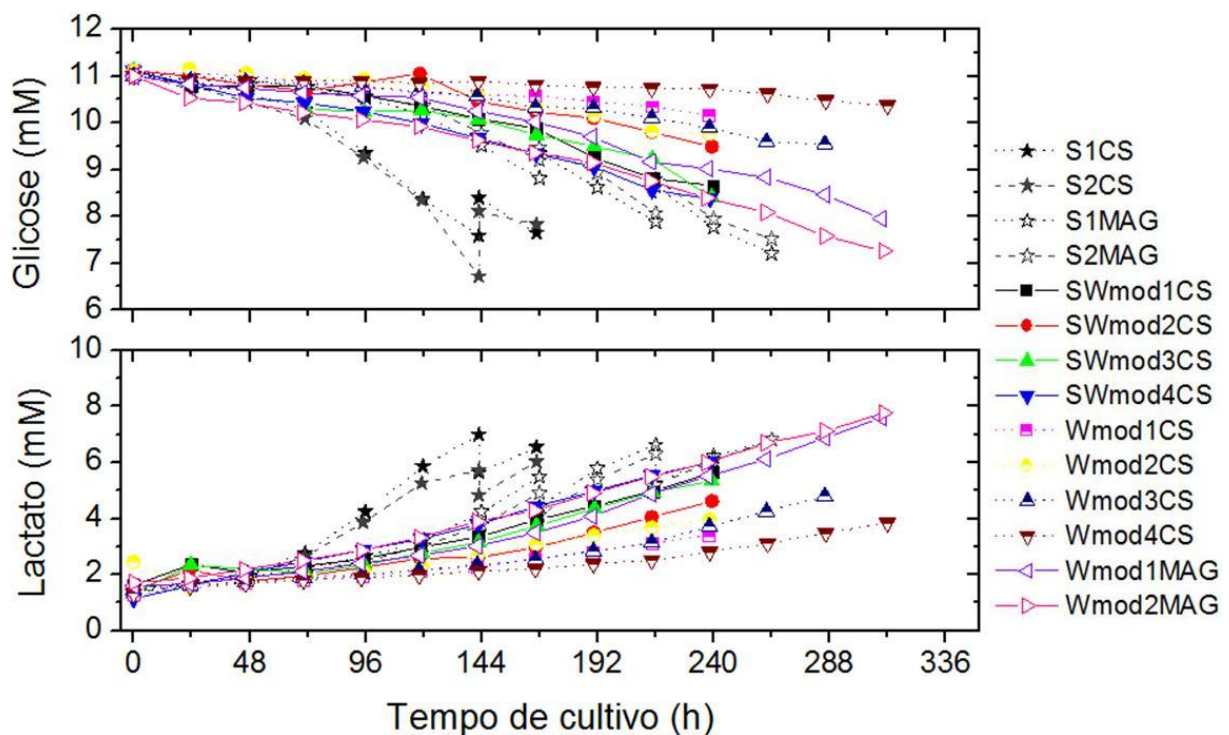
Dentre todos os cultivos realizados, não ocorreram esgotamento de nutrientes como glicose e aminoácidos, e as concentrações de lactato e amônia mantiveram-se abaixo dos níveis inibitórios (SCHOP et al., 2009). Na Figura 64 está apresentado o perfil do consumo de glicose e produção de lactato durante os cultivos realizados.

Através da relação $Y_{lac/glc}$, pode-se inferir que, na maior parte dos cultivos realizados, as CTM-CU metabolizaram glicose primariamente através da rota de fosforilação oxidativa, durante os períodos com valor de $Y_{lac/glc}$ inferior a 2,0 (SCHOP et al., 2010). No cultivo S2_{MAG} foi registrado a maior relação $Y_{lac/glc}$, sendo de 1,98, o que pode indicar que no S2_{MAG} as CTM-CU estavam alternando o metabolismo de consumo de glicose para a rota de glicólise anaeróbica. Os genes HILPD α e HIF1 α , ligados ao ativamento das rotas metabólicas em hipóxia, apresentaram regulação positiva nos cultivos S2_{CS} (FC = 2,02) e S2_{MAG} (FC = 2,08), respectivamente. Esse fato pode ter ocorrido devido à presença de agregados de microcarregadores, com diâmetros médios de 0,292 \pm 0,094 mm (S2_{CS}) e de 0,748 \pm 0,348 mm (S2_{MAG}) ao

término desses cultivos, limitando a transferência de oxigênio para o interior dos agregados.

A utilização da rota de fosforilação oxidativa é importante durante o período de crescimento, possibilitando consumo eficiente de energia para formação de novas estruturas celulares. Porém, a permanência prolongada da CTM-CU utilizando a rota de fosforilação oxidativa gera maior nível de espécies reativas do oxigênio (ROS), podendo culminar no estado de senescência e morte celular (BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014).

Figura 64. Perfil do consumo de glicose e produção de lactato pela CTM-CU nos cultivos Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}.



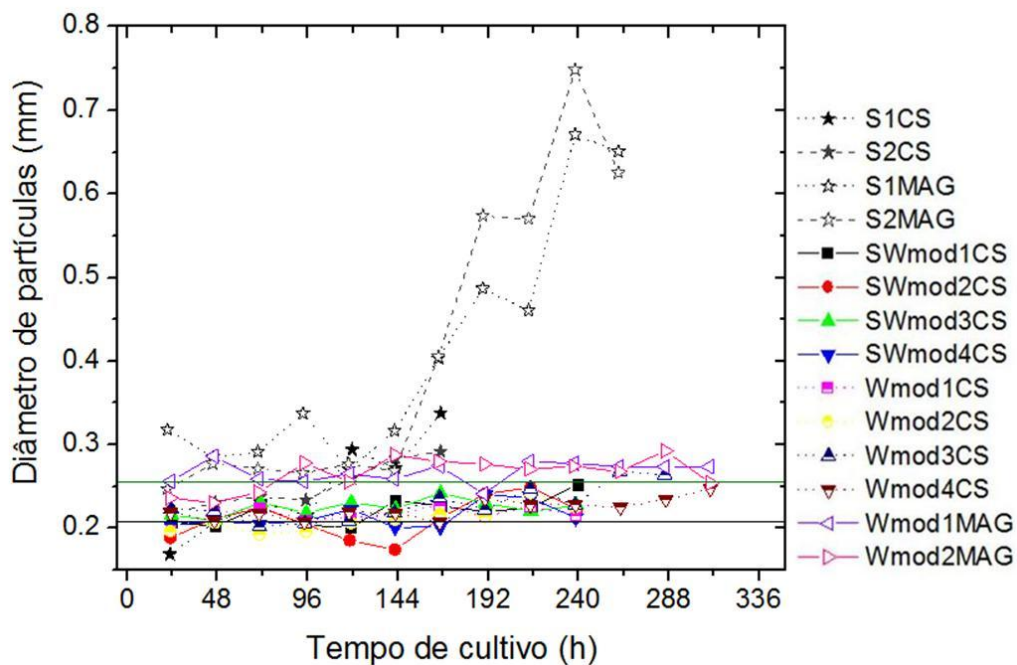
6.4. Distribuição do diâmetro de partículas durante os cultivos da CTM-CU

Os cultivos com o microcarregador CultiSpher-S[®] apresentaram partículas com tamanhos mais uniformes e diâmetros menores que os verificados nos cultivos com o microcarregador MAG. A distribuição do diâmetro das partículas entre os cultivos com o MAG (spinner_{MAG} e W_{modMAG}) apresentou diferença estatística ($p = 0,048$) com 24 horas. Considerando somente os cultivos S1_{MAG} e S2_{MAG}, não foi observada diferença estatística para todos os pontos amostrais ($p > 0,05$), assim como entre os cultivos W_{mod1MAG} e W_{mod2MAG} ($p > 0,05$). Os cultivos com CultiSpher-S[®] (spinner_{CS}, SW_{modCS} e W_{modCS}) apresentaram diferença estatística da distribuição do diâmetro de partículas

após 72 horas ($p = 0,001$). Considerando somente os cultivos S1_{CS} e S2_{CS}, não foi observada diferença estatística para todos os pontos amostrais ($p > 0,05$).

Os cultivos Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod} não apresentaram a mesma intensidade na tendência de aumento do diâmetro dos agregados de partículas ocorrida no frasco spinner. Esse fato pode ser explicado pelo movimento unidirecional da plataforma, não induzindo o choque entre partículas, e ao crescimento não acentuado, comparado ao obtido no spinner. Também se observou nos cultivos no Biorreator WaveTM maior número de microcarregadores sem células ou colonizados com poucas células, mesmo no período avançado do cultivo, conforme relatado anteriormente, o que reduziu o número de microcarregadores com formação de matriz extracelular tal que propiciassem a união entre os mesmos. A Figura 65 apresenta a variação do diâmetro médio de partículas de microcarregadores ao longo dos cultivos realizados.

Figura 65. Dados do diâmetro médio de partículas (microcarregadores e agregados de microcarregadores) durante os cultivos Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}. A linha em preto representa o diâmetro médio dos microcarregadores CultiSpher-S[®] sem células, após hidratação em PBS e autoclavagem. A linha em verde representa o diâmetro médio dos microcarregadores MAG sem células, após hidratação em soro fisiológico e autoclavagem.



A maior agregação ocorrida nos cultivos em frasco spinner está ligada aos fatores relacionados à hidrodinâmica do spinner, favorecendo colisões entre partículas, e ao elevado fator de expansão obtido. A Tabela 11 apresenta a porcentagem de partículas amostradas com diâmetro inferior a 0,300 mm, ao término dos cultivos realizados em Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}. Os cultivos spinner_{MAG} apresentaram entre 9,62 e 14,29% das partículas amostradas com diâmetros inferiores a 0,300 mm, ao término do cultivo, os menores percentuais registrados, seguidos pelos cultivos spinner_{CS}. Nos cultivos SW_{modCS}, W_{modCS} e W_{modMAG}, esses percentuais foram de 80,8±6,0, 82,6±5,2 e 65,1±5,1 %, respectivamente, confirmando a menor tendência de agregação de partículas no biorreator com movimento de agitação ondulatório.

O aumento do diâmetro das partículas pode gerar zonas com baixa concentração de oxigênio e nutrientes e com concentração de metabólitos tóxicos em nível inibitório. Em tecido, a difusão de oxigênio ocorre para espessuras de até 100-200 µm (HOEBEN et al., 2004). Partículas com diâmetro superior a 0,300 mm já podem apresentar regiões com limitação de nutrientes e baixa concentração de oxigênio (KINNEY; SARGENT; MCDEVITT, 2011; SEN; KALLOS; BEHIE, 2001).

Nos cultivos em spinner com microcarregador CultiSpher-S[®] foram obtidos diâmetros médios máximos de 0,337±0,129 mm e de 0,292±0,094 mm, e nos cultivos em spinner com microcarregador MAG foram registrados diâmetros médios máximos de 0,670±0,249 mm e de 0,748±0,348 mm. Esses resultados sugerem que podem ter ocorrido problemas de difusão de nutrientes e oxigênio e eliminação de compostos tóxicos ao término dos cultivos em spinner, especialmente nos cultivos com o MAG.

Tabela 11. Porcentagem de partículas com diâmetro inferior a 0,300 mm ao término dos cultivos realizados em frasco Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}.

Cultivo	Partículas menores que 0,300 mm (%)	Cultivo	Partículas menores que 0,300 mm (%)
S1_{CS}	39,5	SW_{mod}4_{CS}	87,2
S2_{CS}	50,0	W_{mod}1_{CS}	87,5
S1_{MAG}	9,6	W_{mod}2_{CS}	85,5
S2_{MAG}	14,3	W_{mod}3_{CS}	75,7
SW_{mod}1_{CS}	75,3	W_{mod}4_{CS}	81,7
SW_{mod}2_{CS}	76,1	W_{mod}1_{MAG}	61,5
SW_{mod}3_{CS}	84,5	W_{mod}2_{MAG}	68,7

6.5. Vesículas Extracelulares coletadas nos cultivos da CTM-CU

Os dados de quantificação de vesículas extracelulares coletadas dos cultivos com a CTM-CU mostraram que o cultivo no Biorreator Wave™ com microcarregador MAG produziu 2,1 vezes mais VEs/mL quando comparado ao cultivo em frasco spinner com o MAG. Considerando os cultivos no Biorreator Wave™ com microcarregador CultiSpher-S®, $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ e $W_{\text{mod}4\text{CS}}$, o cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ apresentou concentração de VEs 5,5 vezes superior ao obtido no $W_{\text{mod}4\text{CS}}$ e 2,0 vezes superior ao obtido em frasco spinner com o MAG.

A maior relação do número de VEs coletadas por célula foi obtida nos cultivos $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$ e $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$. Esse fato pode estar relacionado a uma condição de estresse promovida pelos frequentes depósitos de microcarregadores no plástico da Cellbag (região de borda líquido-gás). O número de VEs liberadas pelas CTMs e o conteúdo que as VEs carregam é fortemente ligado ao ambiente de cultivo (LIN; DU, 2018; MONSEL et al., 2017). Assim, a análise dos compostos presentes nas VES é essencial para determinar o potencial de aplicação clínica das mesmas. Por ter a sua produção e conteúdo dependentes das condições de cultivo, a produção de vesículas extracelulares pode ser manipulada visando maior obtenção de fatores de interesse empacotados nas VEs.

Conforme já discutido, os cultivos da CTM-CU em spinner com microcarregador MAG apresentaram formação de agregados de microcarregadores com diâmetros na ordem de 0,670 - 0,748 mm, o que pode ter limitado a transferência de oxigênio para o interior dos agregados. Esse fato está em acordo com a expressão positiva obtida do gene HIF1 α , ligado ao metabolismo celular em condição de hipóxia. Estudos indicam que em condição de hipóxia, as CTMs tendem a liberar VEs com função pró-angiogênese, contendo fatores de crescimento, como o VEGF (RANI et al., 2015). A injeção de VEs derivadas de CTMs em condição de hipóxia foram efetivas em melhorar a função cardíaca e reduzir a área afetada após infarto do miocárdio em modelo murino (BIAN et al., 2013).

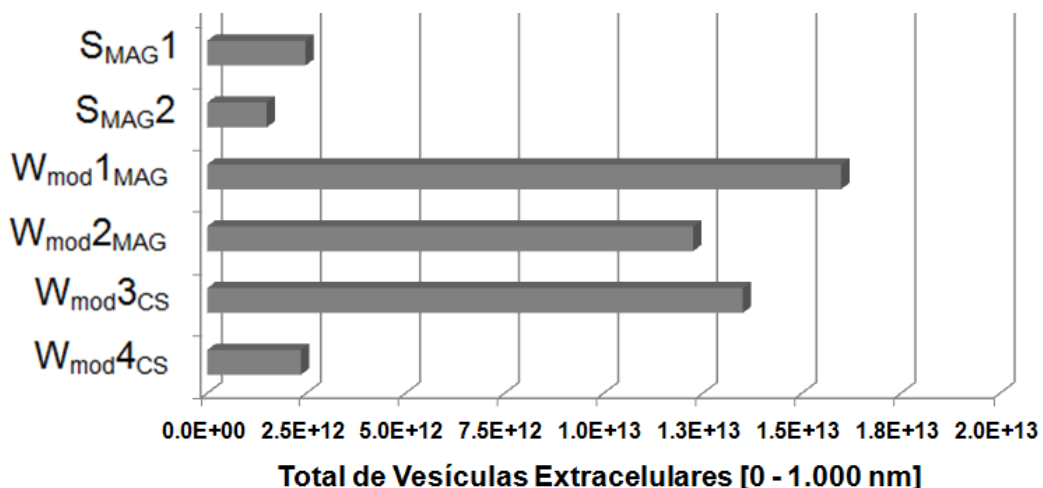
Considerando o exemplo acima citado, o Biorreator Wave™ é uma opção mais adequada para viabilizar a produção de VEs derivadas de CTMs em condição de hipóxia, através do fácil controle da linha de alimentação de gases à Cellbag, em sistema totalmente fechado. Diferentemente do cultivo com o frasco spinner tradicional, onde o controle da atmosfera de cultivo é feito através de incubadora, e sendo necessária abertura do spinner em condição atmosférica padrão durante as amostragens. Além disso, os biorreatores com movimento ondulatório não promovem a agregação dos microcarregadores, em contrário do que foi verificado nos cultivos em

spinner. Nesse sentido, biorreatores com movimento ondulatório são uma opção segura e de fácil manipulação, para obtenção de até 5 L de meio condicionado derivado de CTMs (considerando plataformas para Cellbags de 2 e 10 L, operadas dentro do suporte projetado nesta tese).

Fais e colaboradores (2016), em estudo de revisão do uso clínico de VEs de diferentes fontes celulares, indicaram que o emprego de VEs tem grande potencial na área de nanomedicina (FAIS et al., 2016). Ng e colaboradores (2019) estimaram uma dose clínica média de VEs contendo $2,5 \times 10^{12}$ VEs/dose (NG et al., 2019), em estudo sobre análise de custo da produção de VEs em escala comercial.

Conforme apresentado na Figura 66, considerando uma dose clínica contendo $2,5 \times 10^{12}$ VEs/dose e o total de VEs estimado para os cultivos analisados, os cultivos no Biorreator Wave™ com microcarregador MAG produziram entre 4 - 6 doses clínicas e o cultivo no Biorreator Wave™ com microcarregador CultiSpher-S®, com melhor rendimento, produziu 5 doses clínicas de VEs ($W_{\text{mod}3\text{CS}}$). O cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ apresentou bom desempenho na expansão da CTM-CU, com fator de expansão celular de 24,8 vezes, o que, juntamente com o número estimado de doses clínicas de VEs, é fator importante para viabilizar a produção de VEs visando aplicação clínica, utilizando como produto tanto as VEs produzidas como as células expandidas (NG et al., 2019).

Figura 66. Estimativa do número total de vesículas extracelulares obtidas ao término dos cultivos $S1_{\text{MAG}}$, $S2_{\text{MAG}}$, $W_{\text{mod}1\text{MAG}}$, $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$, $W_{\text{mod}3\text{CS}}$ e $W_{\text{mod}4\text{CS}}$. Volumes de operação: 150 mL (spinner) e 600 mL (Biorreator Wave™). Dose clínica estimada em $2,5 \times 10^{12}$ VEs/dose.



6.6. Expressão gênica da CTM-CU obtida nos cultivos em Biorreator Wave™ e frasco Spinner – Regulação da matriz extracelular e Atividade imunomoduladora

O estudo do perfil de expressão gênica da CTM-CU foi realizado nos cultivos S2_{CS}, S2_{MAG} e W_{mod3CS}, com referência na CTM-CU expandida em modo 2D-estático. As CTM-CU foram coletadas ao término dos cultivos S2_{CS}, S2_{MAG} e W_{mod3CS}, período em que os mesmos já apresentavam agregação e estagnação do crescimento, o que pode justificar a regulação negativa observada em genes ligados ao crescimento celular e organização do material genético. Apesar disso, genes como FOXO1 e FOXQ1, os quais atuam na regulação do ciclo celular, apresentaram regulação positiva de 10,53 (S2_{CS}), 3,46 (S2_{MAG}), e 2,95 vezes (W_{mod3CS}) e 3,74 (S2_{CS}), 5,61 (S2_{MAG}), e 6,91 vezes (W_{mod3CS}), respectivamente. Genes ditos como importantes marcadores para averiguar a funcionalidade das CTMs, como NANOG, OCT4 e SOX2 (PICCINATO et al., 2015), não apresentaram diferença significativa de expressão com relação ao cultivo em modo 2D-estático. Visando utilização clínica, o ideal é realizar a coleta das CTM-CU durante o período de crescimento, onde as células estão no auge de sua atividade metabólica e com menor número de espécies ROS (BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014; VONO; GARCIA; SPINETTI, 2017).

Os cultivos S2_{CS} e S2_{MAG} apresentaram regulação positiva intensa de genes ligados à formação e regulação de matriz extracelular. O cultivo W_{mod3CS} também apresentou regulação positiva intensa de genes ligados aos processos de regulação de matriz extracelular, como o TNXB e o COLEC10 (1º e 20º gene com maior regulação positiva no W_{mod3CS}, respectivamente). Dentre esses genes, houve regulação positiva de MMPs (*matrix metalloproteinases* - metaloproteínases de matriz). As MMPs são endopeptidases responsáveis pela degradação de proteínas presentes na matriz extracelular e atuam, dentre outras funções, na proliferação celular, migração, angiogênese e regulação do tecido gerado (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). Os genes da classe Timp induzem produção de proteínas que inibem a função das metaloproteínases, e atuam em harmonia com as MMPs (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). Entre os cultivos estudados, foi registrada regulação positiva da MMP1, MMP2, MMP3, MMP10 e MMP11 e da Timp1, Timp4 e Timp3, este último apenas no S2_{MAG}.

As MMPs atuam diretamente na cicatrização de feridas na pele, através da regulação da formação de tecido e da disponibilidade de citocinas e fatores de crescimento no local em questão (CALEY; MARTINS; TOOLE, 2015). Hidrodinâmicas de cultivo que promovam a ativação de genes ligados à produção e regulação de matrix extracelular são particularmente importantes para cultivos de CTMs em arcabouços visando utilização para regeneração de tecidos (BEŞKARDEŞ et al., 2016; KEDONG et al., 2014). A regulação positiva do MMP3, por exemplo, influencia a proliferação celular e a diferenciação em osteócitos (ALMALKI; AGRAWAL, 2016). O MMP2 com regulação positiva também influencia a proliferação celular, apresenta atividade pró-angiogênese e de diferenciação em adipócitos e condrócitos (ALMALKI; AGRAWAL, 2016).

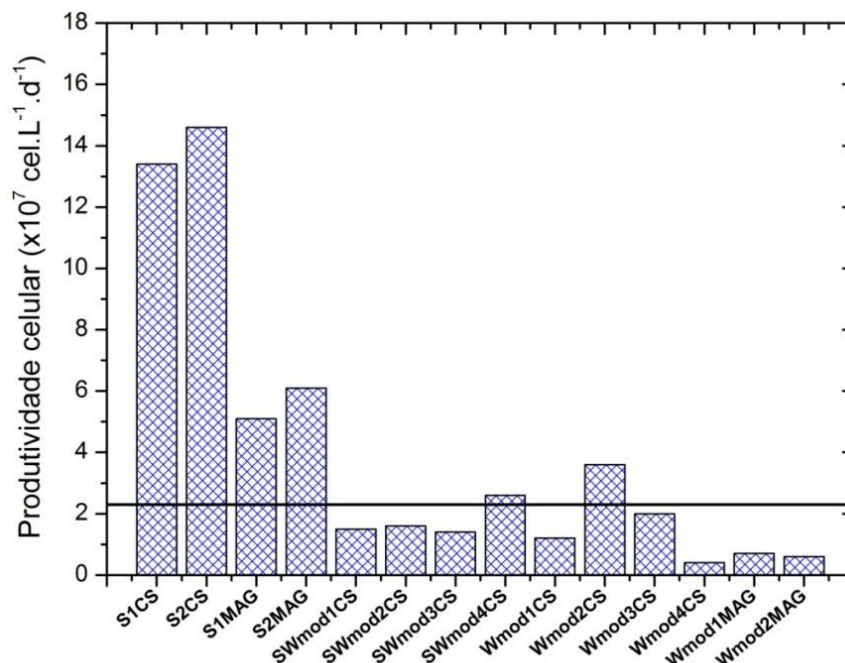
Os cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} apresentaram expressão positiva para várias interleucinas e quimiocinas, as quais estão ligadas à atuação imunomoduladora da CTM (CHAMBERLAIN et al., 2007; GAO et al., 2016). Como exemplo, o gene IL24 (interleucina 24) apresentou regulação positiva de 11,31, 46,17 e 3,17 nos cultivos $S2_{CS}$, $S2_{MAG}$ e W_{mod3CS} , respectivamente. Frith e colaboradores (2010) obtiveram em CTMs cultivadas em agregados celulares, em frasco spinner, regulação positiva do gene IL24 de 75 vezes com base na CTM em cultivo 2D-estático (FRITH; THOMSON; GENEVER, 2010). Os autores apresentaram que a utilização do meio de cultivo condicionado derivado da CTM em cultivo no spinner reduziu a viabilidade de linhagens de células cancerosas, enquanto que a viabilidade de células sadias não foi alterada. Nesse sentido, cultivos que induzam a expressão positiva do gene IL24 nas CTMs apresentam importante potencial para serem utilizados em bioprocessos visando aplicação clínica.

6.7. Potencial de aplicação em escala clínica do bioprocesso de cultivo da CTM-CU em biorreator com movimento ondulatório com modificação do formato da Cellbag

A operação do Biorreator WaveTM com a modificação do formato da Cellbag possibilitou alcançar fatores de expansão celular próximos a 25 vezes, com produtividade celular volumétrica entre 2,0 e $3,6 \times 10^7$ cel.L⁻¹.d⁻¹ (W_{mod3CS} e W_{mod2CS}), realizando as etapas de adesão das células aos microcarregadores e a fase de expansão na Cellbag. Tais níveis de expansão celular são na ordem de 12,5 vezes superiores ao obtido no cultivo da CTM-CU sem alteração no formato da Cellbag.

Embora tenha sido obtida melhora no desempenho do Biorreator Wave™ para cultivo da CTM-CU, a produtividade do mesmo foi cerca de 5,0 vezes menor que a produtividade alcançada nos cultivos em spinner com microcarregador CultiSpher-S® e se manteve próxima à produtividade alcançada em cultivos em modo 2D-estático, nos quais obtêm-se cerca de $2,3 \times 10^7$ cel.L⁻¹.d⁻¹ (Figura 67). Contudo, conforme anteriormente discutido, o cultivo da CTM-CU em modo 2D-estático não é o ideal visando aplicação clínica, uma vez que o ambiente de cultivo e a estrutura do citoesqueleto estão afastados das condições *in vivo* (LIN; DU, 2018; MADL; HEILSHORN; BLAU, 2018). Além disso, cultivos em modo 2D-estático, em geral, requerem maior manipulação e espaço físico. Já a deficiência do frasco spinner está no maior nível de agregação dos microcarregadores, os quais podem problematizar a transferência de massa e a etapa de coleta das células aderidas aos microcarregadores, exigindo maiores tempos de processamento para desadesão das células.

Figura 67. Produtividade celular obtida nos cultivos da CTM-CU em frasco spinner e no Biorreator Wave™. A linha em preto representa a produtividade celular média obtida em cultivos da CTM-CU em modo 2D-estático.



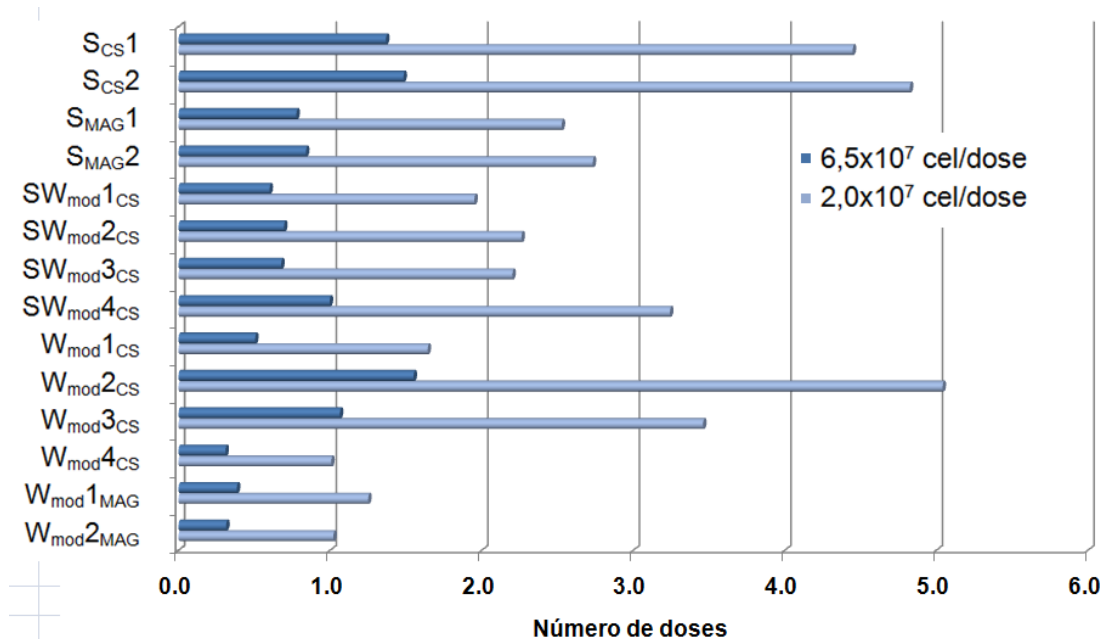
Cunha e colaboradores (2017) em estudo com CTMs derivadas da medula óssea e tecido adiposo, expandidas em biorreator de tanque agitado, avaliaram a integração entre os bioprocessos de expansão celular, coleta das células expandidas e redução de volume (necessário para estocagem e uso clínico). Nesse estudo, obtiveram eficiência final do bioprocessamento em torno de 65% (CUNHA et al., 2017). Para estimar o número de doses clínicas obtidas nos cultivos realizados em frasco Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}, foi considerada a eficiência de 65% com relação ao número máximo de CTM-CU aderidas aos microcarregadores.

Na Figura 68 está apresentada a estimativa do número de doses clínicas, considerando doses com $2,0 \times 10^7$ cel/dose e $6,5 \times 10^7$ cel/dose. Doses clínicas em torno de $6,5 \times 10^7$ cel/dose foram efetivas em estudos clínicos no tratamento de GvHD (fase clínica VII) (PÉREZ-SIMON et al., 2011), esclerose múltipla (fase clínica II) (LLUFRIU et al., 2014) e doença de Crohn (fase clínica I) (MAYER et al., 2013). Doses clínicas menores, com $2,0 \times 10^7$ cel/dose, também se mostraram efetivas em estudos para o tratamento de esclerose múltipla (MOHAJERI et al., 2011) e doença de Crohn (CICCOCIOPPO et al., 2011).

Nos cultivos em frasco spinner com microcarregador CultiSpher-S[®], operados com 200 mL, foi possível obter 1 dose com $6,5 \times 10^7$ cel/dose ou 4 doses com $2,0 \times 10^7$ cel/dose. Nos cultivos no Biorreator Wave[™] com melhor desempenho (SW_{mod4CS}, W_{mod2CS} e W_{mod3CS}), operados com 600 mL, também foi possível obter 1 dose com $6,5 \times 10^7$ cel/dose ou entre 3 e 5 doses com $2,0 \times 10^7$ cel/dose.

As CTM-CU coletadas do Biorreator Wave[™] apresentaram o gene IGF1 com regulação positiva de 12,15 vezes. Estudos indicam que a atuação parácrina de CTMs pela expressão do IGF1 promove reparo em tecidos lesados, como coração, rim e pâncreas (YOUSSEF; ABOALOLA; HAN, 2017). O IGF-1 também atua como neuroprotetor, e se mostrou importante em amenizar dano neural (PANDYA et al., 2012), o que pode ser útil considerando fornecimento de doses clínicas para tratamento da esclerose múltipla, por exemplo.

Figura 68. Estimativa do número de doses clínicas obtidas nos cultivos realizados em frasco Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}, considerando bioprocesso de coleta e estocagem das CTM-CU expandidas com eficiência de 65%. Volumes de operação: 200 mL (spinner_{CS}), 150 mL (spinner_{MAG}) e 600 mL (Biorreator WaveTM). Exemplos de possibilidade de aplicação clínica para: $6,5 \times 10^7$ cel/dose (GvHD, Esclerose múltipla e doença de Crohn); $2,0 \times 10^7$ cel/dose (Esclerose múltipla e doença de Crohn).



A Tabela 12 apresenta a relação dos resultados obtidos nos cultivos da CTM-CU realizados em Spinner, sistema Spinner-WaveTM e Biorreator WaveTM, utilizando os microcarregadores Cultispher-S[®] e MAG.

Com a proposta de modificação do formato da Cellbag, através do suporte desenvolvido nesta tese, os biorreatores com movimento ondulatório podem ser considerados uma alternativa para cultivo de CTMs, assim como de outras culturas que tenham tendência em produzir matriz extracelular e formar agregados de partículas. Nesse modelo de biorreator, com a Cellbag no formato proposto, é possível a produção de doses clínicas tanto de VEs derivadas das CTMs, como CTMs em acordo com os requisitos de qualidade exigidos pelos órgãos reguladores. A funcionalidade desse biorreator pode ainda ser substancialmente incrementada mediante a utilização de Cellbags com novos materiais hidrofóbicos para o filme interno, como foi sugerido, para cultivo de células animais ancorantes, aglomerantes e de alta sensibilidade às condições ambientais, como as CTMs.

Tabela 12. Resultados obtidos nos cultivos da CTM-CU realizados em Spinner, sistema Spinner-Wave™ e Biorreator Wave™.

Parâmetro	Spinner				Spinner-Wave _{mod}				Wave _{mod}					
	S1 _{CS}	S2 _{CS}	S1 _{MAG}	S2 _{MAG}	SW _{mod1} CS	SW _{mod2} CS	SW _{mod3} CS	SW _{mod4} CS	W _{mod1CS}	W _{mod2CS}	W _{mod3CS}	W _{mod4CS}	W _{mod1} MAG	W _{mod2} MAG
Microcarregador	CultiSpher-S®		MAG		CultiSpher-S®				CultiSpher-S®					
N _{cel} /N _{MC} (N _{cel} /N _{MC} em relação às células aderidas)	30 (22,1)	30 (25,0)	7	7	30 (26,8)	30 (27,0)	30	30	30 (13,0)	30 (18,2)	16 (12,9)	6 (4,9)	10 (7,2)	10 (7,7)
Adesão célula-MC (%)	73,5	83,3	100	100	86,3	90	100	100	43,5	60	77	79,4	71,8	77,2
t _{operação} (dias)	7	7	11	11	10	10	10	10	10	10	12	13	13	13
μ (h ⁻¹) (R ²)	0,041 (0,983)	0,053 (0,983)	0,023 (0,999)	0,026 (0,961)	0,017 (0,998)	0,035 (0,997)	0,015 (0,996)	0,013 (0,999)	0,037 (0,932)	0,027 (0,921)	0,021 (0,995)	0,008 (0,942)	0,012 (0,945)	0,007 (0,887)
t _d (h)	16,9	13,1	30,1	26,6	40,8	19,8	46,2	53,3	18,7	25,7	33,0	86,6	57,8	99,0
FE	55,9	53,5	47,9	51,8	7,0	7,7	5,8	8,5	11,6	25,6	24,8	6,3	5,9	5,1
Produtividade Celular (x10 ⁷ cel.L ⁻¹ .d ⁻¹)	13,4	14,6	5,1	6,1	1,5	1,6	1,4	2,6	1,2	3,6	2,0	0,4	0,7	0,6
EVs/cel (x10 ⁴) [40-150 nm]	ND	ND	1,34	0,61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,94	3,15	9,04	7,07
Y _{lac/glc} (mol _{lac} .mol _{glc} ⁻¹)	1,67± 0,19	1,65± 0,26	1,71± 0,12	1,98± 0,67	1,54± 0,65	1,72± 0,84	1,33± 0,17	1,43± 0,32	1,43± 0,51	1,25± 0,40	1,42± 0,84	1,37± 0,46	1,72± 0,71	1,65± 0,50
-q _{glc} (pmol _{glc} .cel ⁻¹ .h ⁻¹)	0,24± 0,18	0,25± 0,19	0,20± 0,04	0,13± 0,03	0,34± 0,14	0,20± 0,13	0,21± 0,08	0,21± 0,06	0,34± 0,17	0,17± 0,09	0,18± 0,14	0,26± 0,06	0,42± 0,18	0,33± 0,12
q _{lac} (pmol _{lac} .cel ⁻¹ .h ⁻¹)	0,42± 0,33	0,39± 0,42	0,34± 0,06	0,30± 0,12	0,42± 0,18	0,29± 0,09	0,28± 0,08	0,30± 0,11	0,49± 0,30	0,21± 0,15	0,18± 0,04	0,35± 0,10	0,62± 0,15	0,52± 0,13
Diâmetro médio máximo de agregado de MCs (mm)	0,337±0,129	0,292±0,094	0,670±0,249	0,748±0,348	0,253±0,093	0,249±0,090	0,242±0,084	0,240±0,078	0,228±0,084	0,242±0,113	0,268±0,135	0,247±0,108	0,279±0,148	0,293±0,139
Nível máximo de depósito de MCs nas paredes da Cellbag	-	-	-	-	3	1	2	3	1	3	2	2	3	2

Cultivos W_{nomai}: FE: 0-2,0; Produtividade Celular: 0-0,8 (x10⁷ cel.L⁻¹.d⁻¹). Cultivo 2D-estático: Produtividade Celular: 2,3x10⁷ cel.L⁻¹.d⁻¹. ND: análise não determinada.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foram elaboradas as seguintes conclusões:

1. Foi constatado que o filme interno da Cellbag é hidrofóbico e apresenta irregularidades na superfície. Durante os cultivos com a CTM-CU, o filme interno da Cellbag tornou-se hidrofílico e com rugosidade inferior a do filme de uma Cellbag não utilizada em cultivo. Após tratamento do filme interno da Cellbag usada em cultivo com tripsina-EDTA, o filme apresentou aumento da rugosidade para valor semelhante ao da condição de uma Cellbag nova e restituição parcial do caráter hidrofóbico. Assim, pode-se deduzir que ocorreu deposição de compostos presentes no meio de cultivo nas irregularidades da superfície do filme, como proteínas e lipídeos, aumentando a molhabilidade do mesmo. Esse aumento da molhabilidade favoreceu a retenção de microcarregadores no plástico da Cellbag. Este problema poderá ser resolvido pelo fabricante através do desenvolvimento de um novo material hidrofóbico para o filme interno da Cellbag.
2. Durante a fase de adesão das células aos microcarregadores na Cellbag, ocorre sedimentação das células no plástico da Cellbag nas regiões sem microcarregadores. Para contornar o problema, o volume da fase de adesão deve ser baixo, para que a superfície molhada da Cellbag contenha poucas regiões com espaços vazios (sem microcarregadores). Além disso, a manutenção da Cellbag em modo estático durante as primeiras 24 h também possibilitou melhor adesão das células aos microcarregadores.
3. A modificação do formato da Cellbag através do uso do suporte, desenvolvido nesta tese, possibilitou alterar o regime de escoamento do fluido. Com a Cellbag operada dentro do suporte, o depósito de microcarregadores “tipo duna” não ocorreu. Com a operação da Cellbag inserida no suporte foi possível obter fatores de expansão celular superiores aos reportados na literatura para expansão de CTM em biorreator com movimento ondulatório e próximos aos reportados para modelos de biorreatores tradicionais.

4. Os cultivos Spinner-Wave_{mod} apresentaram FE entre 5,8 (Spinner-Wave_{mod}3) e 8,5 (Spinner-Wave_{mod}4). Nos cultivos Wave_{mod}, com microcarregador Cultispher-S[®], obteve-se FE entre 6,3 (Wave_{mod}4_{CS}) e 25,6 (Wave_{mod}2_{CS}). O menor FE obtido nos cultivos Spinner-Wave_{mod} em comparação aos cultivos Wave_{mod} com melhor desempenho (Wave_{mod}2_{CS} e Wave_{mod}3_{CS}) foi atribuído à transferência das células do frasco spinner para o Biorreator Wave[™] e a necessidade de adaptação das células à mudança na hidrodinâmica de agitação.
5. Os cultivos Wave_{mod} com microcarregador MAG apresentaram menor crescimento, o que se assumiu estar relacionado à maior deposição de microcarregadores na superfície lateral da Cellbag, na região de borda líquido-gás, quando comparado aos cultivos com Cultispher-S[®].
6. As CTM-CU coletadas nos cultivos no Biorreator Wave[™] e nos cultivos controle em frasco spinner apresentaram os requisitos de qualidade: manutenção da capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos, osteócitos e condrócitos e expressão dos marcadores de superfície característicos de CTM.
7. Os cultivos S2_{CS}, S2_{MAG} e W_{mod}3_{CS} apresentaram regulação positiva de genes que estavam ligados às funções biológicas de adesão celular, resposta inflamatória, resposta imune, organização da matriz extracelular e produção de colágeno.
8. O Biorreator Wave[™] apresentou a maior relação de vesículas extracelulares, com diâmetros entre 40-150 nm, por CTM-CU. Para tal faixa de diâmetro de partículas, no Biorreator Wave[™] foram obtidas entre 2,94 - 3,15 x 10⁴ VEs/cel com o microcarregador Cultispher-S[®] e 7,07 - 9,04 x 10⁴ VEs/cel com o microcarregador MAG. Cultivos controle em spinner apresentaram concentração de 0,61 - 1,34 x 10⁴ VEs/cel com o microcarregador MAG.
9. Através do conhecimento acerca da operação do biorreator com movimento ondulatório, obtido nesta tese, será possível a elaboração de processos de cultivo de CTMs nesse modelo de biorreator, para uso em escala clínica, visando à produção do meio condicionado derivado das CTMs e CTMs em acordo com os requisitos de qualidade exigidos pelos órgãos reguladores.

8. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

São apresentadas as seguintes sugestões para estudos futuros:

1. Realizar cultivos da CTM-CU no Biorreator Wave™, com modificação do formato da Cellbag, substituindo o soro fetal bovino por suplementos *xeno-free*, a fim de averiguar o perfil de expansão da CTM-CU em condições mais apropriadas para aplicação clínica.
2. Realizar estudos de expressão gênica, caracterização dos fatores tróficos e componentes empacotados nas vesículas extracelulares presentes no meio condicionado derivado da CTM-CU, obtido em cultivos isentos de soro fetal bovino no Biorreator Wave™, com modificação do formato da Cellbag, com amostras coletadas durante o período de crescimento e ao término do cultivo.
3. Avaliar tratamentos no filme interno da Cellbag que evitem a adsorção de compostos presentes no meio de cultivo e, assim, possibilitem a manutenção do caráter hidrofóbico sem comprometer a qualidade do cultivo, contribuindo na redução dos depósitos de partículas ao longo das paredes da Cellbag, na região de borda líquido-gás.
4. Através da fluidodinâmica computacional, realizar estudos das condições de operação aplicadas no cultivo da CTM-CU no Biorreator Wave™ com modificação do formato da Cellbag, obtendo dados precisos de potência dissipada, tensão de cisalhamento e agitação mínima para suspensão de partículas (N_{S1u}).

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**, v. 15, n. 2, p. 109–116, 8 nov. 2007.
- AGRAWAL, H. et al. Human adipose-derived stromal/stem cells demonstrate short-lived persistence after implantation in both an immunocompetent and an immunocompromised murine model. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, 2014.
- AKERS, J. C. et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal Neurooncol.**, v. 113, n. 1, p. 1–11, 2013.
- ÅKERSTRÖM, H. **Expansion of adherent cells for cell therapy**. [s.l.] Uppsala University, 2009.
- AL-RUBEAI, M. **Animal Cell Culture**. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer International Publishing, 2015.
- ALFRED, R. et al. Efficient suspension bioreactor expansion of murine embryonic stem cells on microcarriers in serum-free medium. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 811–823, 2011.
- ALIMPERTI, S. et al. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 4, p. 974–983, 2014.
- ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, n. 7:129, p. 1–12, 2016.
- AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: CASTILHO, L. R. et al. (Eds.). **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. NY: Taylor & Francis Group, 2008. p. 75–110.
- ANKRUM, J.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 5, p. 203–209, 2010.
- BADENES, S. M. et al. Microcarrier Culture Systems for Stem Cell Manufacturing. In: CABRAL, J. M. S. et al. (Eds.). **Stem Cell Manufacturing**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016.
- BARTOSH, T. J. et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 31, p. 13724–13729, 2010.
- BCC RESEARCH. The Global Market for Stem Cells. n. May 2016-BIO035F, 2016.
- BCC RESEARCH. Single-use Technologies for Biopharmaceuticals: Global Markets. n. June 2017-BIO099C, 2017.
- BECQUART, P. et al. Human mesenchymal stem cell responses to hydrostatic pressure and shear stress. **Eur Cell Mater**, v. 31, p. 160–173, 2016.
- BEŞKARDEŞ, I. G. et al. Bone tissue engineering with scaffold-supported perfusion co-cultures of human stem cell-derived osteoblasts and cell line-derived osteoclasts. **Process Biochemistry**, v. 59, Part B, p. 303–311, 2017.
- BHANG, S. H. et al. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2734–2747, 2011.
- BIAN, S. et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. **J Mol M**, v. 92,

n. 4, p. 387–397, 2013.

BIGARELLA, C. L.; LIANG, R.; GHAFARI, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. **Development**, v. 141, n. 22, p. 4206–4218, 2014.

BOS, C. VAN DEN et al. Therapeutic Human Cells: Manufacture for Cell Therapy/Regenerative Medicine. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, n. 138, p. 61–97, 2014.

BROWN, M. A. et al. The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, n. 27, p. 3928–3935, 2007.

BUTLER, M. **Animal Cell Culture & Technology**. Second Edition. New York: Bios Scientific Publishers, 2004.

CALEY, M. P.; MARTINS, V. L. C.; TOOLE, E. A. O. Metalloproteinases and Wound Healing. **ADVANCES IN WOUND CARE**, v. 4, n. 4, p. 225–234, 2015.

CAPLAN, A. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641–50, 1991.

CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. **Cellular Physiology**, n. June, p. 341–347, 2007.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076–1084, 2006.

CHA, J. M. et al. Efficient scalable production of therapeutic microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

CHAMBERLAIN, G. et al. Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.

CHAPMAN, R. G. et al. Polymeric thin films that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacteria. **Langmuir**, v. 17, n. 4, p. 1225–1233, 2001.

CHENG, H. et al. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 8, p. 5161–5168, 2011.

CICCOCIOPPO, R. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.**, n. 60, p. 788–798, 2011.

CLINCKE, M.-F. et al. Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE Bioreactor™-part II: Applications for antibody production and cryopreservation. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 3, p. 768–77, 2013.

COSTA, M. H. G. et al. Tridimensional configurations of human mesenchymal stem/stromal cells to enhance cell paracrine potential towards wound healing processes. **Journal of Biotechnology**, v. 262, n. June, p. 28–39, 2017.

COSTA, M. H. G. et al. Hematopoietic Niche – Exploring Biomimetic Cues to Improve the Functionality of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 2, 2018.

CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J. F.; WANG, D. I. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 29, n. 1, p. 130–41, 1987.

CUNHA, B. et al. Bioprocess integration for human mesenchymal stem cells: From up

- to downstream processing scale-up to cell proteome characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 248, p. 87–98, 2017.
- DECARLI, M. C. et al. S2 cell culture in a WAVE Bioreactor: potential for scaling up the production of the recombinant rabies virus glycoprotein. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 11, p. 4773–4783, 2018.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.
- DOS SANTOS, F. et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 1116–1127, 2014.
- DUFF, S. E. et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 9, p. 984–992, 2003.
- EIBES, G. et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. **Journal of biotechnology**, v. 146, n. 4, p. 194–7, 15 abr. 2010.
- EIBL, D.; EIBL, R.; PETRA KOHLER. **Single-use technology in biopharmaceutical production. Dechema Biotechnologie**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.dechema.de/dechema_media/StatPap_SingleUse_2011_englisch-p-4298.pdf>.
- EIBL, R. et al. **Cell and Tissue Reaction Engineering**. [s.l.] Springer, 2009.
- EIBL, R.; EIBL, D. **Disposable Bioreactors**. [s.l.: s.n.]. v. 132
- EIBL, R.; WERNER, S.; EIBL, D. Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, n. April, p. 55–87, 2009.
- ESCH, E. W.; BAHINSKI, A.; HUH, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 4, p. 248–260, 2015.
- ESPINHA, N. M. M. **Bioprocess engineering of induced pluripotent stem cells for application in cell therapy and pre-clinical research**. [s.l.] Universidade Nova de Lisboa, 2014.
- ESTRONCA, L.; FERREIRA, L. **Stem Cells for the Regeneration of Chronic Wounds**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016.
- FAIS, S. et al. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 10, n. 4, p. 3886–3899, 2016.
- FERNANDES, T. G. et al. Stem cell bioprocessing for regenerative medicine. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 34–47, 2014.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. Sixth Edit ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 16, n. 3, p. 381–390, 1966.
- FRITH, J. E.; THOMSON, B.; GENEVER, P. G. Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential. **Tissue Engineering: Part C**, v. 16, n. 4, p. 735–749, 2010.
- GALLEU, A. et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. **Science Translational Medicine**, v. 7828, p. 1–12,

2017.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 1, p. e2062, 2016.

GE. **Vaccine process development using Cytodex™ microcarriers in WAVE™ Bioreactor systems**. GE Healthcare Bio-Sciences. [s.l.: s.n.].

GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES. Disposable Cellbag™ bioreactors for WAVE Bioreactor™ systems. **Data file 28-9511-36 AG**, p. 1–16, 2014.

GIL, L. V. G. **Avaliação da expansão de células estromais mesenquimais em biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT)**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2015.

GOTTSCHALK, U. Disposables in Downstream Processing. In: EIBL, R.; EIBL, D. (Eds.). **Disposable Bioreactors**. [s.l.] Springer, 2009. v. 115p. 171–83.

GREGORIADES, N. et al. Cell Damage of Microcarrier Cultures as a Function of Local Energy Dissipation Created by a Rapid Extensional Flow. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 2, p. 171–182, 2000.

GRSKOVIC, M. et al. Induced pluripotent stem cells — opportunities for disease modelling and drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. December, 2011.

GULDE, P. E.; CAMPBELL, A. M.; VEMURI, M. C. Expansion and Characterization Considerations for the Manufacturing of Stem Cells. In: CABRAL, J. M. S. et al. (Eds.). **Stem Cell Manufacturing**. 1st Edition. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. p. 215–231.

GYORGY, B. et al. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49726, 2012.

HARASZTI, R. A. et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 12, p. 1–10, 2018.

HARE, J. M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 24, p. 2277–2286, 2009.

HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino Acid Analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, n. 136, p. 65–74, 1984.

HEWITT, C. J. et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 11, p. 2325–35, nov. 2011.

HOEBEN, A. N. N. et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 4, p. 549–580, 2004.

HU, L. et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–11, 2016.

HU, W.-S. **Cell Culture Bioprocess Engineering**. 1.1 ed. Minneapolis. 2012.

HUNT, M. M. et al. Bioprocess Development for the Expansion of Embryonic Stem Cells. **Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering**, v. 3, p. 49–72, 2011.

INOUE, H. et al. iPS cells: a game changer for future medicine. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 5, p. 409–417, 2014.

- JANASZAK, M. M.; WOLFE, R. P.; T. AHSAN. Biomechanics in Stem Cell Manufacturing. In: CABRAL, J. M. S. et al. (Eds.). **Stem Cell Manufacturing**. 1st Edition. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. p. 27–42.
- JOSSEN, V. et al. Mass Production of Mesenchymal Stem Cells — Impact of Bioreactor Design and Flow Conditions on Proliferation and Differentiation. **Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine**, p. 119–174, 2014.
- JOSSEN, V. et al. Theoretical and Practical Issues That Are Relevant When Scaling Up hMSC Microcarrier Production Processes. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
- JOSSEN, V. et al. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 3981–3994, 2018.
- KAISER, S. C. et al. Fluid flow and cell proliferation of mesenchymal adipose-derived stem cells in small-scale, stirred, single-use bioreactors. **Chemie-Ingenieur-Technik**, v. 85, n. 1–2, p. 95–102, 2013.
- KATSUDA, T. et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Proteomics**, v. 13, n. 10–11, p. 1637–1653, 2013.
- KAY, A. G. et al. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- KEDONG, S. et al. Dynamic Fabrication of Tissue-Engineered Bone Substitutes Based on Derived Cancellous Bone Scaffold in a Spinner Flask Bioreactor System. **Appl Biochem Biotechnol**, n. 174, p. 1331–1343, 2014.
- KINNEY, M. A.; SARGENT, C. Y.; MCDEVITT, T. C. The Multiparametric Effects of Hydrodynamic Environments on Stem Cell Culture. **Tissue Engineering**, v. 17, n. 4, 2011.
- KITAMBI, S. S.; CHANDRASEKAR, G. A model for screening, discovery and development of drugs. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 4, n. 1, p. 51–59, 2011.
- KNAZEK, R. A. et al. Cell Culture on Artificial Capillaries: An Approach to Tissue Growth in vitro. **Science**, v. 178, p. 65–67, 1972.
- KUMAR, A.; STARLY, B. Large scale industrialized cell expansion: producing the critical raw material for biofabrication processes. **Biofabrication**, v. 7, n. 4, p. 1–14, 2015.
- KYUN CHOI, C. et al. A study on dynamic separation of silica slurry using a rotating membrane filter: 2. Modelling of cake formation. **Journal of Membrane Science**, v. 157, n. 2, p. 177–187, 1999.
- LAWSON, T. et al. Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50 L single-use stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 49–62, 2017.
- LECHANTEUR, C. Large-Scale Clinical Expansion of Mesenchymal Stem Cells in the GMP-Compliant, Closed Automated Quantum® Cell Expansion System: Comparison with Expansion in Traditional T-Flasks. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 8, p. 1–11, 2014.
- LEE, J. et al. Controlling cell geometry on substrates of variable stiffness can tune the degree of osteogenesis in human mesenchymal stem cells. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 38, n. October, p. 209–218, 2014.

- LEE, Y. BIN et al. Engineering spheroids potentiating cell-cell and cell-ECM interactions by self-assembly of stem cell microlayer. **Biomaterials**, v. 165, p. 105–120, 2018.
- LIN, L.; DU, L. The role of secreted factors in stem cells-mediated immune regulation. **Cellular Immunology**, v. 326, n. February 2017, p. 24–32, 2018.
- LLUFRIU, S. et al. Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2014.
- LÖFFELHOLZ, C. et al. Dynamic Single-Use Bioreactors Used in Modern Liter - and m³ - Scale Biotechnological Processes: Engineering Characteristics and Scaling Up. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 2013.
- LÜ, X. et al. A proteomics study to explore the role of adsorbed serum proteins for PC12 cell adhesion and growth on chitosan and collagen/chitosan surfaces. **Regenerative Biomaterials**, n. July, p. 1–13, 2018.
- LUBINIECKI, A. S. **Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology**. Nova York: Marcel Dekker, 1990.
- MA, N.; KOELLING, K. W.; CHALMERS, J. J. Fabrication and Use of a Transient Contractile Flow Device to Quantify the Sensitivity of Mammalian and Insect Cells to Hydrodynamic Forces. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 4, p. 428–437, 2002.
- MADL, C. M.; HEILSHORN, S. C.; BLAU, H. M. Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. **Nature**, v. 557, n. 7705, p. 335–342, 2018.
- MARQUES, J. C. M. T. et al. Identification of new genes associated to senescent and tumorigenic phenotypes in mesenchymal stem cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- MARTIN, C. et al. Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 231–243, 2017.
- MASY, V. S. Production of disposable bags: a manufacturer's report. In: EIBL, R.; EIBL, D. (Eds.). **Single-use technology in biopharmaceutical manufacture**. [s.l.] Wiley, Hoboken, 2011.
- MAYER, L. et al. Safety and Tolerability of Human Placenta-Derived Cells (PDA001) in Treatment-Resistant Crohn's Disease: A Phase 1 Study Lloyd. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 19, n. 4, p. 754–760, 2013.
- MINCIACCHI, V. R. et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11327–11341, 2015.
- MIZUKAMI, A. et al. Stirred tank bioreactor culture combined with serum-/xenogeneic-free culture medium enables an efficient expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 8, p. 1048–1059, 2016.
- MIZUKAMI, A. et al. Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion: Experimental performance and cost of goods analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 135, p. 36–48, 2018.
- MOHAJERI, M. et al. FOXP3 Gene Expression in Multiple Sclerosis Patients Pre- and Post Mesenchymal Stem Cell Therapy. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 10, n. September, p. 155–161, 2011.
- MONSEL, A. et al. Mesenchymal Stem Cell Derived Secretome and Extracellular Vesicles for Acute Lung Injury and Other Inflammatory Lung Diseases. **Expert Opin**

Biol Ther., v. 16, n. 7, p. 859–871, 2017.

MUHAMMAD, G. et al. Transplanted adipose-derived stem cells can be short-lived yet accelerate healing of acid-burn skin wounds: a multimodal imaging study. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.

NEUHUBER, B. et al. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 9, p. 1176–1185, 2008.

NG, K. S. et al. Bioprocess decision support tool for scalable manufacture of extracellular vesicles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, p. 307–319, 2019.

NIENOW, A. W. et al. Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 108, p. 24–29, 2016.

NIRMALANANDHAN, V. S.; SITTAMPALAM, G. S. Stem Cells in Drug Discovery, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: Emerging Opportunities and Challenges. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 7, p. 755–768, 2009.

OLSEN, J. V.; ONG, S.; MANN, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 6, p. 608–614, 2004.

ÖNCÜL, A. A. et al. Characterization of flow conditions in 2 L and 20 L wave bioreactors using computational fluid dynamics. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 1, p. 101–110, 2010.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY**, v. 8, n. March, p. 221–233, 2007.

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

PANDYA, R. S. et al. Neuroprotection for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Role of Stem Cells, Growth Factors, and Gene Therapy. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem.**, v. 12, n. 1, p. 15–27, 2012.

PARK, I. et al. Constitutive stabilization of hypoxia-inducible factor alpha selectively promotes the self-renewal of mesenchymal progenitors and maintains mesenchymal stromal cells in an undifferentiated state. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 9, p. e44-11, 2013.

PÉREZ-SIMON, J. A. et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft- versus -host disease: results of a phase I/II clinical trial. **Haematologica**, v. 96, n. 7, p. 1072–1076, 2011.

PHINNEY, D. G. et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–15, 2015.

PICCINATO, C. A. et al. High OCT4 and Low p16INK4A Expressions Determine In Vitro Lifespan of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2015, n. Article ID 369828, p. 11 pages, 2015.

PINTO, D. S.; DA SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Scalable Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Bioreactors: A Focus on Hydrodynamic Characterization. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 1–14.

PITTINGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 2 abr. 1999.

- PLACZEK, M. R. et al. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 6, n. 32, p. 209–32, 6 mar. 2009.
- PÖRTNER, R. Bioreactors for Mammalian Cells. In: **Animal Cell Culture**. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer International Publishing, 2015.
- RAFIQ, Q. A. et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 L stirred-tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 8, p. 1233–1245, 2013.
- RAFIQ, Q. A. et al. Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 4, p. 473–486, 2016.
- RANI, S. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 5, p. 812–823, 2015.
- RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.
- RAWLINGS, B.; PORA, H. A prescriptive approach to management of solid waste from Single-Use Systems. **BioProcess International**, v. 7, n. 3, p. 40–47, 2009.
- REICHARDT, A. et al. Large Scale Expansion of Human Umbilical Cord Cells in a Rotating Bed System Bioreactor for Cardiovascular Tissue Engineering Applications. **The Open Biomedical Engineering Journal**, v. 7, p. 50–61, 2013.
- REN, G. et al. Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. **J Immunol**, p. 2321–2328, 2010.
- REN, J. et al. Intra-subject variability in human bone marrow stromal cell (BMSC) replicative senescence: Molecular changes associated with BMSC senescence. **Stem Cell Research**, v. 11, n. 3, p. 1060–1073, 2013.
- ROBINTON, D. A. A.; DALEY, G. G. Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 295–305, 2012.
- RODRIGUES, C. A. V et al. Stem cell cultivation in bioreactors. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 815–29, 2011.
- RODRIGUES, C. A. V; NOGUEIRA, D. E. S.; CABRAL, J. M. Next-generation stem cell expansion technologies. **Cell & Gene Therapy Insights**, v. 4, n. 8, p. 791–804, 2018.
- ROWLEY, J. et al. Meeting lot-size challenges of manufacturing adherent cells for therapy. **BioProcess International**, v. 10, n. SUPPL. 3, p. 16–22, 2012.
- SANTIAGO, P. A.; GIORDANO, R. D. C.; SUAZO, C. A. T. Performance of a vortex flow bioreactor for cultivation of CHO-K1 cells on microcarriers. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 35–45, 2011.
- SANTOS, F. DOS et al. Scaling-up Ex Vivo Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Cellular Therapies. **Stem Cell Biology and Regenerative Medicine**, p. 1–14, 2013.
- SART, S. et al. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 5, p. 365–380, 2014.
- SART, S. et al. Regulation of mesenchymal stem cell 3D microenvironment: From macro to microfluidic bioreactors. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 1, p. 43–57, 2016.
- SCHIRMAIER, C. et al. Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell

- production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 3, p. 292–303, 2014.
- SCHNITZLER, A. C. et al. Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges. **Biochemical Engineering Journal**, v. 108, p. 3–13, 2016.
- SCHOP, D. et al. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. **Tissue engineering**, v. 15, n. 8, p. 1877–1886, 2009.
- SCHOP, D. et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, n. October 2009, p. 131–140, 2010.
- SCHOP, D. **Growth and metabolism of mesenchymal stem cells cultivated on microcarriers**. Enschede, The Netherlands: University of Twente, maio 2010.
- SEN, A.; KALLOS, M. S.; BEHIE, L. A. Effects of hydrodynamics on cultures of mammalian neural stem cell aggregates in suspension bioreactors. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 23, p. 5350–5357, 2001.
- SERRA, M. et al. Microencapsulation Technology: A Powerful Tool for Integrating Expansion and Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells. v. 6, n. 8, p. 1–13, 2011.
- SHI, Q. et al. GMSC-derived exosomes combined with a chitosan/silk hydrogel sponge accelerates wound healing in a diabetic rat skin defect model. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–16, 2017.
- SHUKLA, A. A.; GOTTSCHALK, U. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 147–154, 2013.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. Second Edition. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall PTR, 2002.
- SIMÕES, I. N. et al. Human mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: Successful isolation and ex vivo expansion using serum-/xeno-free culture media. **Biotechnology journal**, v. 8, n. April, 2013.
- SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. **CYTOTECHNOLOGY**, v. 30, p. 149–158, 1999.
- SUAZO, C. A. T.; MOREIRA, F. M. A.; WODEWOTZKY, T. I. **Processo para produção de microcarregador de espuma biocompatível e biodegradável para uso em cultivo in vitro de células animais aderentes, e microcarregador obtido no processo**. BR 10 2016 001877-3 Brazil, 2016.
- SUN, L. Y. et al. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. **Cell Proliferation**, v. 43, n. 5, p. 445–456, 2010.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.
- TEIXEIRA, F. G. et al. Do hypoxia/normoxia culturing conditions change the neuroregulatory profile of Wharton Jelly mesenchymal stem cell secretome? **Stem Cell Research and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2015.
- THOMASSEN, Y. E. et al. Transfer of an adherent Vero cell culture method between two different rocking motion type bioreactors with respect to cell growth and metabolic rates. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 288–296, fev. 2012.

- TIMMINS, N. E. et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 7, p. 1817–26, jul. 2012.
- TROUNSON, A.; MCDONALD, C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 1, p. 11–22, 2015.
- TSAI, A.-C. et al. Aggregation kinetics of human mesenchymal stem cells under wave motion. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 5, p. 1600448, 2017.
- VÉLIZ, E. C.; RODRÍGUEZ, G.; CARDERO, A. F. Bioreactors for animal cells. In: CASTILHO, L. R. et al. (Eds.). **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. NY: Taylor & Francis Group, 2008. p. 221–258.
- VONO, R.; GARCIA, E. J.; SPINETTI, G. Oxidative Stress in Mesenchymal Stem Cell Senescence: Regulation by Coding and Noncoding RNAs. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 2017.
- WATSON, D. C. et al. Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. **Biomaterials**, v. 105, p. 195–205, 2016.
- WEI, X. et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 747–754, 2013.
- WILLMS, E. et al. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 738, p. 1–17, 2018.
- WODEWOTZKY, T. I. **Desenvolvimento de microcarregador poroso como suporte para a expansão e recuperação de células estromais mesenquimais**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- XU, L. C.; SIEDLECKI, C. A. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. **Biomaterials**, v. 28, n. 22, p. 3273–3283, 2007.
- YOUSSEF, A.; ABOALOLA, D.; HAN, V. K. M. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. **Stem Cell International**, v. 2017, p. 12 pages, 2017.
- YUAN, Y. et al. Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 8, n. 3, p. 210–225, 2012.
- ZHAN, C. et al. Study of hydrodynamics in wave bioreactors by computational fluid dynamics reveals a resonance phenomenon. **Chemical Engineering Science**, v. 193, p. 53–65, 2019.
- ZHANG, G. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Consensus Genes: Implication for the Risk of Tumorigenesis and Cancers in Induced Pluripotent Stem Cell Therapy. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 6, p. 955–964, 2012.
- ZHAO, F. et al. Effects of oxygen transport on 3-D human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: Experiments and mathematical model. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1269–1280, 2005.
- ZWI-DANTSIS, L.; GEPSTEIN, L. Induced pluripotent stem cells for cardiac repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 19, p. 3285–3299, 2012.

Apêndice 1. Curva padrão da análise de células viáveis pelo método MTT.

Cultivo S1_{CS}

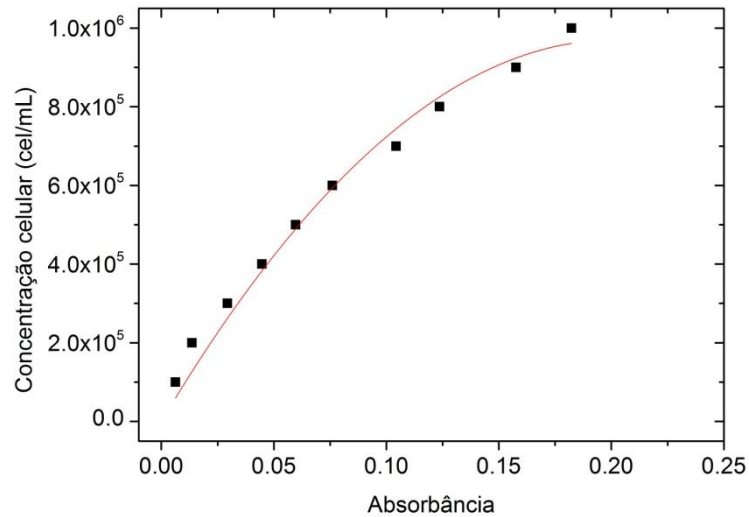


Figura 69 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo S1_{CS}. Equação de ajuste $y = -2,383E7x^2 + 9,617E6x$, com coeficiente de determinação de 0,995.

Cultivos S2_{CS} e W_{mod}3_{CS}

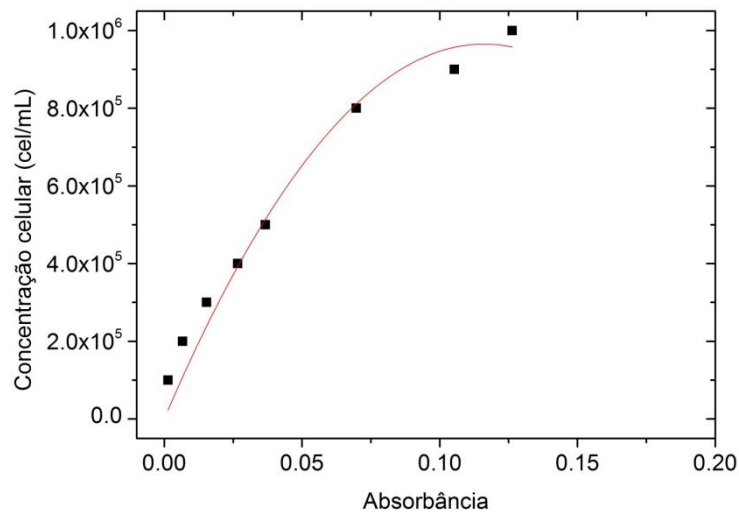


Figura 70 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivos S2_{CS} e W_{mod}3_{CS}. Equação de ajuste $y = -7,161E7x^2 + 1,666E7x$, com coeficiente de determinação de 0,989.

Cultivos SW_{mod1CS} e SW_{mod2CS}

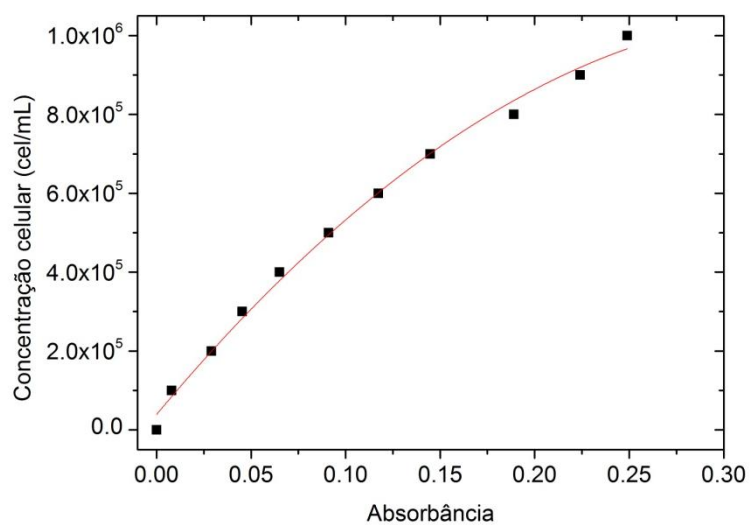


Figura 71 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivos SW_{mod1} e SW_{mod2}. Equação de ajuste $y = -8,12E6x^2 + 5,74E6x + 3,87E4$ com coeficiente de determinação de 0,994.

Cultivos SW_{mod3CS} e SW_{mod4CS}

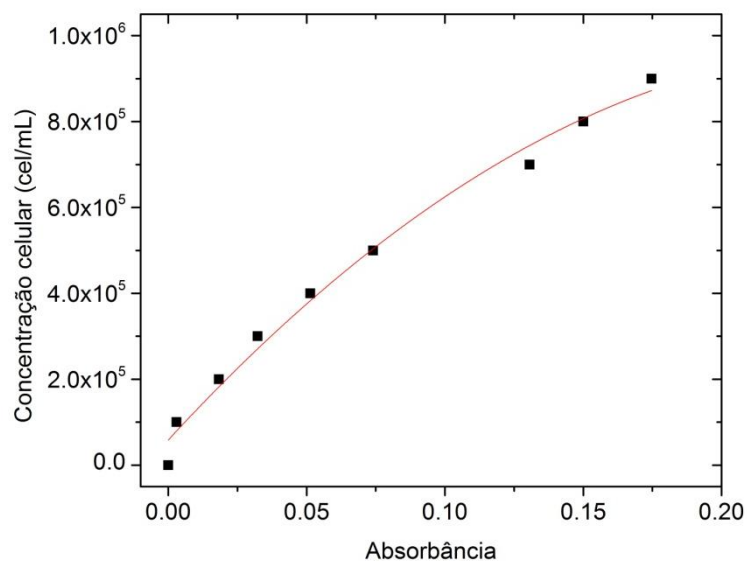


Figura 72 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivos SW_{mod3} e SW_{mod4}. Equação de ajuste $y = -1,34E7x^2 + 7,01E6x + 5,8E4$, com coeficiente de determinação de 0,986.

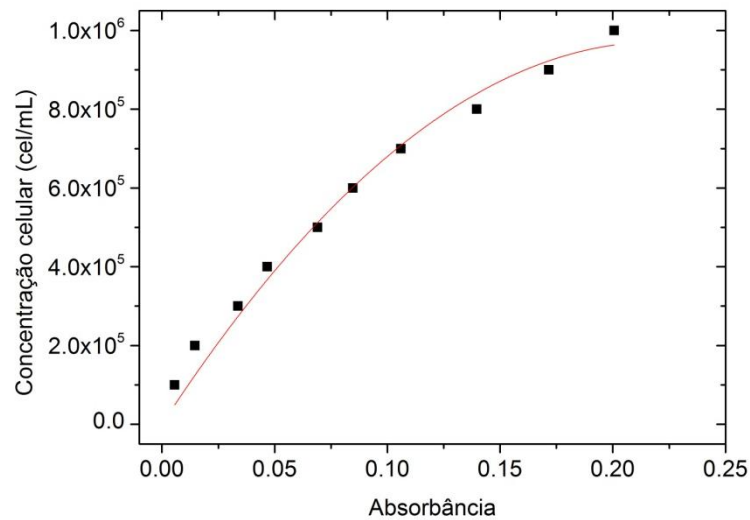
Cultivo W_{mod1CS} 

Figura 73 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo W_{mod1CS} . Equação de ajuste $y = -1,98577E7x^2 + 8,78482E6x$, com coeficiente de determinação de 0,995.

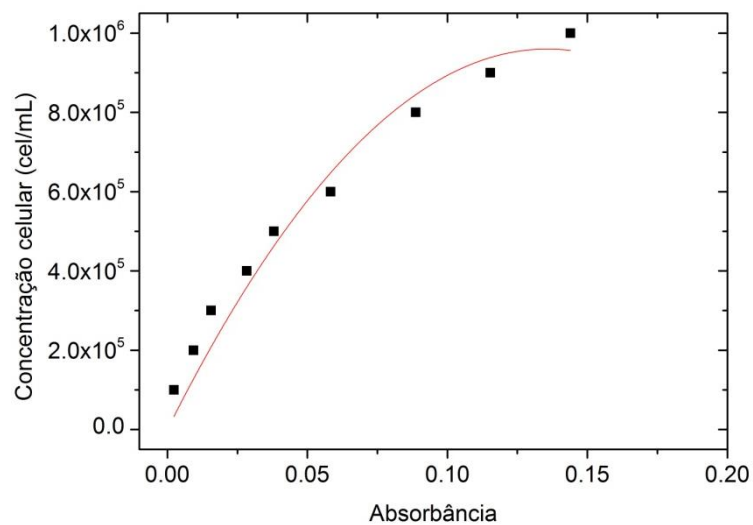
Cultivo W_{mod2CS} 

Figura 74 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo W_{mod2CS} . Equação de ajuste $y = -5.21E7x^2 + 1.41439E7x$, com coeficiente de determinação de 0,989.

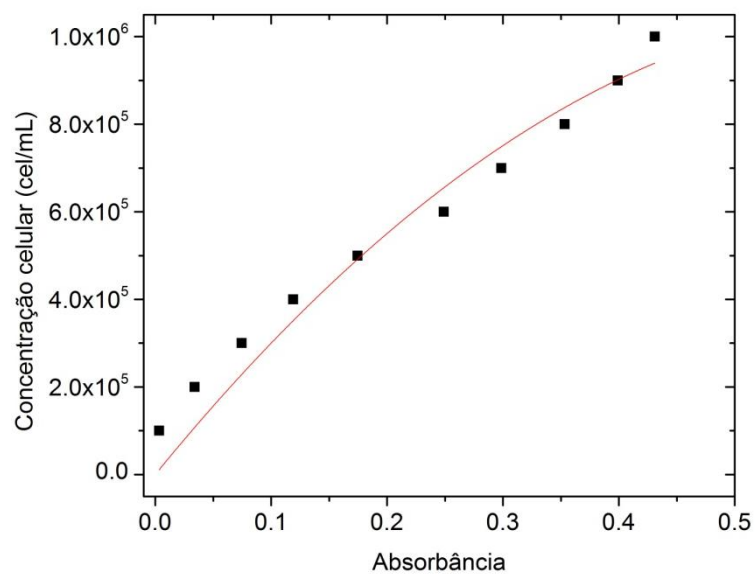
Cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$ 

Figura 75 – Curva padrão da análise de MTT – Cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$. Equação de ajuste $y = -2,47E6x^2 + 3,24E6x$, com coeficiente de determinação de 0,989.

Apêndice 2. Dados dos cultivos Spinner, Spinner-Wave_{mod} e Wave_{mod}: número de células aderidas aos microcarregadores; concentração de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia; porcentagem de CO₂; pH; agitação e lista dos aminoácidos com consumo superior à 60%.

Tabela 13. Dados do cultivo S1_{CS}.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	2.45E+06	0	11.11	2.34	2.91	1.39		16.0	7.212	int	-	-
48	5.09E+06	9						15.0	7.211	int	-	
72	1.07E+07	24	10.92			1.65		13.5	7.101	50	-	
96	2.84E+07	24						13.5	7.083	50	-	
120	1.06E+08	48	10.65	2.33	3.07	2.05		10.0	7.143	50	-	
144	1.37E+08	72	10.27			2.76	1.11	8.0	7.177	50	-	
168	1.27E+08	96	9.34	1.71	3.07	4.24		6.0	7.219	50	-	
		120	8.38	1.59	3.18	5.85	1.45	6.0	7.183	50	-	
		144	7.59	1.57	3.23	6.99		6.0	7.154	50	-	
		144	8.39	1.58	3.59	5.64	1.57	6.0	7.206	50	-	
		168	7.65	1.68	3.43	6.54	1.57	6.0	7.168	50	-	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão.

Tabela 14. Dados do cultivo S2_{CS}.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	2.78E+06	0	11.11			1.36		16.0	7.199	int	-	valina
48	2.21E+06	9						18.0	7.276	int	-	
72	9.84E+06	24	10.79			1.63		15.0	7.112	50	-	
96	4.37E+07	24						15.0	7.108	50	-	
120	9.81E+07	48	10.45	3.06	3.95	1.94		9.5	7.227	50	-	
144	1.48E+08	72	10.09			2.63	1.14	9.0	7.245	50	-	
168	1.19E+08	96	9.26	2.24	3.37	3.85		8.5	7.253	50	-	
		120	8.34	2.14	3.57	5.25	1.21	8.5	7.217	50	-	
		144	6.72	2.04	3.03	5.72	1.24	8.5	7.170	50	-	
		144	8.11	1.97	3.31	4.83		8.5	7.100	50	-	
168		168	7.83	1.92	3.72	6.02	1.22	8.0	7.115	50	-	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão.

Tabela 15. Dados do cultivo S1_{MAG-}

Tempo (h)	Número de células aderidas	Viabilidade (%)	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	1.63E+06	71.4	0	11.11	2.79	2.32	1.53		17.5	7.213	int	-	-
48	3.50E+06	84.6	9						17.5	7.330	int	-	
72	5.81E+06	87.1	24	11.00			1.72	0.26	17.5	7.276	50	-	
96	7.69E+06	94.3	48	10.90	2.10	1.88	1.95		17.5	7.235	50	-	
120	1.38E+07	92.7	72	10.77			2.24		15.0	7.268	50	-	
144	2.35E+07	94.1	96	10.54			2.65	0.54	13.5	7.265	50	-	
168	4.18E+07	96.6	120	10.16	2.30	2.57	3.23		13.0	7.014	50	-	
192	4.29E+07	94.3	144	9.51			4.24	0.68	13.0	7.193	50	-	
216	5.10E+07	93.5	168	8.81	1.76	2.38	5.48		10.5	7.234	50	-	
240	6.11E+07	93.5	168	9.34			4.42		10.0	7.202	50	-	
264	7.78E+07	91.0	192	8.62			5.78	1.53	10.0	7.113	50	-	
			216	7.88	1.45	2.19	6.62		10.0	7.073	50	-	
			216	8.63			5.23		10.0	7.072	50	-	
			240	7.76			6.20		10.0	7.109	50	-	
			264	7.20	1.34	2.11	6.81	1.85	9.0	7.100	50	-	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão.

Tabela 16. Dados do cultivo S2_{MAG-}

Tempo (h)	Número de células aderidas	Viabilidade (%)	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	1.63E+06	81.6	0	11.11	2.79	2.32	1.53		17.5	7.213	int	-	glutamina
48	2.38E+06	85.5	9						17.5	7.367	int	-	
72	4.75E+06	93.4	24	10.68			1.68	0.35	17.5	7.199	50	-	
96	6.06E+06	87.6	48	10.81	1.77	1.56	1.89		17.5	7.216	50	-	
120	1.58E+07	91.7	72	10.66			2.11		15.0	7.253	50	-	
144	2.94E+07	93.6	96	10.57			2.49	0.86	13.5	7.321	50	-	
168	4.20E+07	94.1	120	10.37			3.01		13.0	7.085	50	-	
192	5.25E+07	92.6	144	9.77			3.76	1.24	13.0	7.197	50	-	
216	6.36E+07	90.5	168	9.19	1.89	2.39	4.90		10.5	7.265	50	-	
240	8.41E+07	92.9	168	9.46	1.58	1.79	4.10		10.0	7.184	50	-	
264	8.10E+07	90.5	192	8.92			5.37		10.0	7.176	50	-	
			216	8.07	1.61	2.26	6.30	1.85	10.0	7.147	50	-	
			216	8.80			5.19		10.0	7.176	50	-	
			240	7.94			6.06		10.0	7.180	50	-	
			264	7.52	1.05	1.57	6.81	1.43	9.0	7.117	50	-	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão.

Tabela 17. Dados do cultivo SW_{mod1CS}.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	8.63E+06	0	11.11	2.73	2.52	1.62		14.0	7.107	0	int	-	glutamina
48	1.05E+07	10						13.5	7.158	24	20	4	
72	9.98E+06	24	10.79			2.36		13.5	6.994	48	20	4	
96	1.14E+07	24						10.0	7.27	48	27	4	
120	1.78E+07	48	10.79	2.25	2.41	2.06	0.74	10.0	7.066	72	27	4	
144	2.62E+07	72	10.79	2.14	2.41	2.31		8.0	7.133	96	27	4	
168	4.17E+07	96	10.59			2.56		8.0	7.236	96	24	4	
192	4.84E+07	120	10.36	1.56	2.28	2.98	1.09	6.0	7.293	120	24	4	
216	6.01E+07	144	10.08			3.35		6.0	7.249	144	24	4	
240	3.82E+07	168	9.88	1.33	2.35	3.95		6.0	7.265	168	24	4	
		192	9.25	1.13	2.26	4.45	1.53	6.0	7.238	168	27	3	
		216	8.81	0.94	2.22	4.97		6.0	7.221	192	27	3	
		240	8.65	0.72	2.12	5.63	1.76	6.0	7.176	216	27	3	
										240	27	3	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão realizada em frasco spinner.

Tabela 18. Dados do cultivo SW_{mod2CS}.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	9.00E+06	0	11.11	3.03	2.86	1.42		13.5	7.258	0	int	-	glutamina
48	1.38E+07	9						18.0	7.365	24	15	7	metionina
72	9.38E+06	24	11.00			2.17		18.0	7.055	48	15	7	fenilalanina
120	1.19E+07	24						9.0	7.249	48	15	5	
144	1.13E+07	48	10.82	2.58	2.46	1.78	0.95	9.0	7.168	72	15	5	
168	2.84E+07	72	10.68	2.26	2.99	1.94		7.0	7.222	72	24	4	
192	6.10E+07	120		1.58	2.30		1.29	6.0	7.291	96	24	4	
216	5.52E+07	144	10.46			2.61		6.0	7.287	120	24	4	
240	6.97E+07	168	10.23	1.26	2.28	2.96		6.0	7.285	144	24	4	
		192	10.10	1.11	2.24	3.5	1.53	6.0	7.264	168	24	4	
		216	9.80	0.99	2.31	4.05		6.0	7.259	192	24	4	
		240	9.49	0.86	2.26	4.61	1.65	6.0	7.254	192	26	3	
										216	26	3	
										216	27	3	
										240	27	3	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão realizada em frasco spinner.

Tabela 19. Dados do cultivo SW_{mod3CS}.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	1.18E+07	0	11.11	2.70	2.27	1.3		14.0	7.119	0	int	-	glutamina
48	1.12E+07	9						15.0	7.228	24	15	7	
72	1.27E+07	24	9.98			2.34		13.5	7.126	48	15	7	
96	2.23E+07	48	11.21	2.59	2.11	1.67	0.75	11.0	7.160	48	24	4	
120	2.04E+07	72	10.29	1.93	2.23	2.05		9.5	7.135	72	24	4	
144	3.04E+07	96	10.23			2.34		8.0	7.237	96	24	4	
168	4.13E+07	120	10.27	1.71	2.25	2.76	0.96	8.0	7.205	120	24	4	
192	6.22E+07	144	10.08			3.16		7.5	7.198	144	24	4	
216	6.78E+07	168	9.75	1.33	2.23	3.73		7.0	7.256	168	24	4	
240	6.68E+07	192	9.49	1.19	2.26	4.35	1.41	7.0	7.254	168	27	3	
		216	9.23	1.06	2.21	4.93		7.0	7.264	192	27	3	
		240	8.40	0.90	2.17	5.34	1.76	7.0	7.275	216	27	3	
										240	27	3	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão realizada em frasco spinner.

Tabela 20. Dados do cultivo SW_{mod4CS}.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	1.18E+07	0	11.11	2.49	2.27	1.14		15.0	7.188	0	int	-	glutamina
48	2.25E+07	9						15.0	7.344	24	15	7	
72	1.85E+07	24		2.17	2.19			13.5	7.155	48	15	7	
120	3.65E+07	48	10.53			2.08	1.06	10.0	7.170	48	24	4	
144	4.84E+07	72	10.43	1.89		2.47		8.0	7.269	96	24	4	
168	6.66E+07	96	10.24			2.88		8.0	7.231	120	24	4	
192	9.11E+07	120	9.98	1.63	2.14	3.27	1.19	8.0	7.223	144	24	4	
216	9.98E+07	144	9.68			3.78		8.0	7.274	168	24	4	
240	8.63E+07	168	9.33	1.44	2.18	4.43		8.0	7.261	168	27	3	
		192	9.06	1.25	2.15	4.97	1.57	8.0	7.249	192	27	3	
		216	8.56	1.10	2.12	5.53		8.0	7.172	216	27	3	
		240	8.38	0.93	2.16	6.00	1.83	6.5	7.208	216	33	2	
										240	33	2	

*int: agitação intermitente durante a fase de adesão realizada em frasco spinner.

Tabela 21. Dados do cultivo W_{mod1CS} .

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	4.35E+06	0	11.11	2.31	2.50	1.31		8.5	7.143	0	2	2	glutamina
48	4.21E+06	9						8.5	7.112	9	5	3	
72	4.28E+06	24		2.41	3.26			8.5	7.167	24	5	3	
96	4.20E+06	24						8.5	7.21	24	24	4	
120	8.35E+06	48	11.01			1.70	0.90	8.5	7.262	48	24	4	
144	5.20E+06	72	10.87	1.50	2.21	1.82		8.5	7.275	72	24	4	
168	8.27E+06	96	10.77			1.96		8.5	7.262	96	24	4	
192	1.33E+07	120	10.62	0.83	1.35	2.13	1.29	8.9	7.282	120	24	4	
216	4.93E+07	144	10.59			2.29		8.9	7.272	144	24	4	
240	5.06E+07	168	10.58	0.77	1.41	2.55		9.0	7.305	168	24	4	
		192	10.46	0.80	1.54	2.81	1.44	8.5	7.277	192	24	4	
		216	10.35	0.90	1.90	3.12		8.5	7.286	216	24	4	
		240	10.16	0.98	2.10	3.40	1.70	8.5	7.284	240	24	4	

Tabela 22. Dados do cultivo $W_{\text{mod}2\text{CS}}$.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	6.05E+06	0	11.11			1.19		10.0	6.835	0		estático	glutamina
48	5.18E+06	9						10.0	6.926	24	24	4	prolina
72	6.88E+06	24	11.16	2.58	3.97	1.54		8.5	7.142	48	24	4	
96	1.42E+07	24						8.5	7.248	72	24	4	
120	2.88E+07	48	11.06			1.72	0.88	8.5	7.25	96	24	4	
144	3.42E+07	72	10.95	2.15	3.86	1.88		8.5	7.261	120	24	4	
168	1.14E+08	96	10.93			2.09		8.5	7.268	144	24	4	
192	1.35E+08	120	10.77	0.75	1.49	2.29	1.20	8.5	7.284	168	24	4	
216	1.35E+08	144	10.59			2.69		8.5	7.292	192	24	4	
240	1.55E+08	168	10.32	1.11	1.46	3.07		8.5	7.257	216	24	4	
		192	10.15	1.06	2.19	3.41	1.57	8.5	7.287	240	24	4	
		216	9.81	0.84	1.83	3.68		8.5	7.253				
		240	9.77	0.80	1.83	3.97	1.83	8.5	7.278				

Tabela 23. Dados do cultivo $W_{\text{mod}3\text{CS-}}$

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	4.29E+06	0	11.00	3.76	3.04	1.45		10.5	7.153	0		estático	-
48	4.16E+06	6						10.5	7.315	24	24	4	
72	4.91E+06	24	10.90			1.62		10.5	7.048	48	24	4	
96	8.77E+06	24						10.5	7.091	72	24	4	
120	1.26E+07	48	10.88	3.56	3.05	1.76	0.12	9.5	7.404	96	24	4	
144	1.65E+07	72	10.83			1.89		10.0	7.385	120	24	4	
168	2.06E+07	96	10.77			2.01		10.0	7.378	144	24	4	
192	3.20E+07	120	10.67	3.25	3.33	2.15	0.25	10.0	7.381	168	24	4	
216	5.99E+07	144	10.57			2.35		10.0	7.399	192	24	4	
240	9.59E+07	168	10.34			2.54		10.5	7.380	216	24	4	
264	1.07E+08	192	10.32	2.14	2.56	2.83	0.32	10.5	7.389	240	24	4	
288	1.06E+08	216	10.11			3.14		10.5	7.386	264	24	4	
		240	9.90	1.26	1.71	3.71	0.95	10.5	7.148	288	24	4	
		264	9.60			4.25		9.5	7.291				
		288	9.54	1.67	2.77	4.79	1.11	9.5	7.243				

Tabela 24. Dados do cultivo $W_{\text{mod}4\text{CS}}$.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	4.90E+06	0	11.00	1.99	1.94	1.33		9.5	7.040	0		estático	-
48	4.87E+06	6						9.5	7.226	24	24	4	
72	7.38E+06	24	10.89			1.60		10.0	7.233	48	24	4	
96	8.09E+06	24						10.0	7.342	72	24	4	
120	8.16E+06	48	10.88	2.59	2.74	1.68	0.47	10.0	7.274	96	24	4	
144	8.39E+06	72	10.89			1.80		10.0	7.284	120	24	4	
168	9.55E+06	96	10.89	1.96	2.34	1.90		10.0	7.307	144	24	4	
192	1.03E+07	120	10.85			1.98	0.97	10.0	7.299	168	24	4	
216	1.17E+07	144	10.89			2.12		10.0	7.307	192	24	4	
240	1.29E+07	168	10.80			2.21		10.0	7.325	216	24	4	
264	1.43E+07	192	10.76	1.57	2.55	2.38		10.0	7.315	240	24	4	
288	2.00E+07	216	10.74			2.51	1.85	10.0	7.337	264	24	4	
312	3.10E+07	240	10.72	1.58	3.04	2.81		10.0	7.272	288	24	4	
		264	10.62			3.11		10.0	7.245	312	24	4	
		288	10.48	1.33	2.66	3.47		10.0	7.253				
		312	10.37	1.38	3.08	3.84	2.35	10.0	7.239				

Tabela 25. Dados do cultivo $W_{mod1MAG}$.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Viabilidade (%)	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	6.47E+06	84.5	0	11.00	3.45	3.00	1.59		10.5	7.030	0	estático		glutamina
48	5.40E+06	86.3	6						10.5	7.134	24	24	4	
72	6.22E+06	79.0	24	10.83			1.67		10.5	7.235	48	24	4	
96	1.18E+07	78.6	24						10.5	7.278	72	24	4	
120	1.18E+07	75.2	48	10.75	3.10	3.02	1.89	0.36	10.5	7.344	96	24	4	
144	1.84E+07	78.5	72	10.64	3.14		2.11		10.5	7.380	120	24	4	
168	1.86E+07	82.1	96	10.58			2.40		10.5	7.374	144	24	4	
192	2.88E+07	81.2	120	10.54	2.62	2.94	2.68	0.81	10.5	7.335	168	25	3	
216	2.31E+07	84.2	144	10.25			3.01		10.5	7.457	192	25	3	
240	3.51E+07	87.6	168	10.02	1.94	2.48	3.49		10.7	7.407	216	25	3	
264	3.44E+07	86.8	192	9.70			4.07		10.7	7.365	240	25	3	
288	3.85E+07	88.4	216	9.17	1.85	2.61	4.87	1.53	11.0	7.450	264	25	3	
312	3.28E+07	87.3	240	9.02			5.50		11.0	7.386	288	25	3	
			264	8.83	1.60	2.65	6.11		11.0	7.357	312	25	3	
			288	8.46			6.87		11.0	7.347				
			312	7.95	1.33	2.74	7.59	2.24	11.0	7.239				

Tabela 26. Dados do cultivo $W_{\text{mod}2\text{MAG}}$.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Viabilidade (%)	Tempo (h)	Glc (mM)	Gln (mM)	Arg (mM)	Lac (mM)	NH ₃ (mM)	CO ₂ (%)	pH	Tempo (h)	rpm	Ângulo (°)	Aminoácidos c/ consumo > 60%
24	6.94E+06	94.0	0	11.0	3.25	2.84	1.72		10.0	6.945	0	estático		glutamina
48	9.89E+06	87.7	6						10.0	7.024	24	25	3	
72	1.27E+07	80.0	24	10.5			1.87		10.0	7.126	48	25	3	
96	1.27E+07	85.0	24						10.0	7.211	72	25	3	
120	2.44E+07	90.5	48	10.4	3.07	2.95	2.18	0.341	10.0	7.338	96	25	3	
144	2.19E+07	88.6	72	10.2	3.04	2.94	2.50		10.0	7.384	120	25	3	
168	3.11E+07	87.3	96	10.1			2.86		10.0	7.366	144	25	3	
192	2.88E+07	88.1	120	9.9	2.74	3.76	3.32	0.874	10.0	7.370	168	25	3	
216	3.57E+07	89.6	144	9.6			3.89		10.0	7.346	192	25	3	
240	2.92E+07	83.8	168	9.4	2.03	2.68	4.28		10.0	7.359	216	24	3	
264	3.14E+07	89.3	192	9.2			4.90		10.0	7.251	240	24	3	
288	2.85E+07	84.6	216	8.8	1.74	2.65	5.48	1.613	10.0	7.248	264	24	3	
312	2.81E+07	88.3	240	8.4			5.98		10.0	7.26	288	24	3	
			264	8.1	1.54	2.66	6.69		10.0	7.239	312	25	3	
			288	7.6			7.10		10.0	7.263				
			312	7.3	1.28	2.70	7.76	2.185	10.0	7.197				