

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

JULIANA DE SÁ DA SILVA

BIORREATOR WAVE COMO ALTERNATIVA
PARA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

SÃO CARLOS

2015

**BIORREATOR WAVE COMO ALTERNATIVA
PARA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS**

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

JULIANA DE SÁ DA SILVA

BIORREATOR WAVE COMO ALTERNATIVA
PARA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Engenharia Química na área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador:

Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

SÃO CARLOS

2015

iii

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586bw Silva, Juliana de Sá da.
Biorreator *wave* como alternativa para expansão de células estromais mesenquimais / Juliana de Sá da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
111 f.

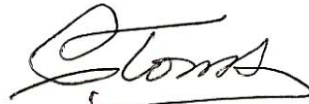
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Biorreatores. 2. Bioprocessos. 3. Células-tronco mesenquimais. 4. Biorreator de ondas. 5. Dispositivos descartáveis. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JULIANA DE SÁ DA SILVA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 05 DE MARÇO DE 2015.

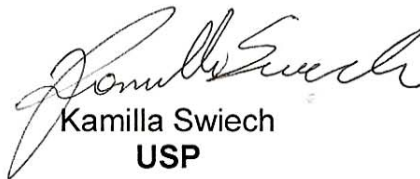
BANCA EXAMINADORA:



Cláudio Alberto Torres Suazo
(Orientador), UFSCar



Álvaro de Baptista Neto
UNESP



Kamilla Swiech
USP

À minha querida avó,
Olga Martins Lima.

In Memoriam

Aos meus pais, Mozarte e
Sílvia Regina, e aos meus irmãos,
Rodrigo e Ricardo, dedico.
Amo vocês.

“Nature loves simplicity and unity.”

Johannes Kepler

(1571 - 1630)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o amor e compreensão, pelo apoio e pelas palavras de ânimo e confiança em todos os momentos difíceis. Mesmo tão longe, vocês estavam sempre perto de mim.

Ao professor Claudio Alberto Torres Suazo, por acreditar e confiar no meu trabalho.

Aos amigos do LATECC, Ana, Diogo, Genoveva, Gizella, Monize, Paula, Thaila e Viviana, por todos os momentos alegres e por sempre me incentivarem e apoiarem nas horas mais complicadas. Em especial à Thaila, Genoveva e Diogo, por me ensinarem as artimanhas do trabalho com as CEMs e por toda a ajuda com os experimentos e análises.

Ao Me. Ricky Gavelán, Departamento de Física - UFSCar, pela elaboração do sistema de vibração da Cellbag.

À equipe do Hemocentro de Ribeirão Preto - USP por disponibilizar laboratório e equipamentos e pelo apoio para realizar análises.

RESUMO

As células estromais mesenquimais (CEMs) estão sendo visadas pela comunidade científica no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas terapêuticas em diferentes ramos da medicina. As CEMs estão presentes em pequenas concentrações nos tecidos, o que torna necessário a sua expansão *in vitro* para viabilizar pesquisas e a aplicabilidade terapêutica. Tratam-se de células com elevada sensibilidade em relação às condições do ambiente de cultivo. Assim, para o aumento da produtividade *in vitro* utiliza-se a tecnologia de biorreatores no desenvolvimento de processos com objetivo de produzir altas densidades celulares em curto tempo, de forma econômica e respeitando as normas impostas pelos órgãos reguladores. O novo conceito de biorreator descartável, como o do biorreator com movimento induzido em forma de ondas, ou biorreator Wave, apresenta possibilidade de operação em sistema fechado segundo as boas práticas de fabricação (BPF), controlado e automatizado. O custo de investimento e operação reduzido, com menor risco de contaminação, maior nível de biossegurança, somado ao fato de utilizar uma tecnologia pouco explorada e já aprovada pelo FDA (Food and Drugs Administration) se transforma numa alternativa de bioprocessamento altamente atrativa para cultivo de células animais em larga escala. Nesse contexto, o presente trabalho tem por meta avaliar o desempenho do biorreator Wave 2/10 na expansão das CEMs. Para tal, foram realizados experimentos visando caracterizar o comportamento do cultivo nesse biorreator a fim de obter alta produtividade celular mantendo a potencialidade terapêutica das CEMs. Os experimentos foram realizados com saco plástico (doravante Cellbag) de 2 L e microcarregador (MC) Cultispher-S com 300 mL meio de cultivo α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina e 15% v/v de soro fetal bovino a 37°C e pH entre 6,9-7,4. Nos experimentos preliminares constatou-se que grande parte das células inoculadas não aderiam aos microcarregadores. Comprovou-se que tal comportamento se devia à baixa relação entre área de adesão (A_{MC} = área total projetada dos microcarregadores) e área de superfície molhada da Cellbag ($A_{SMCellbag}$) que na condição normal de operação resultava numa adesão entre 25,7 e 61,7% das células inoculadas. Para melhorar a adesão foram realizados experimentos reduzindo a $A_{SMCellbag}$, o que possibilitou melhoria na adesão celular em até 100%. Na etapa de expansão celular verificou-se baixo desempenho, presumivelmente vinculado a problemas de operação como: segregação de microcarregadores em determinadas regiões do biorreator provocando o esgotamento de nutrientes, formação de agregados de MCs colonizados com células e adesão dos MCs à Cellbag. Em adição, notou-se que diminuindo a relação CEM/MC no início do cultivo a expansão celular podia ser aumentada para valores iguais ou maiores que 10. Ao todo, os resultados mostraram que o biorreator Wave possui bom potencial para a expansão de CEMs e que o mesmo ainda pode ser melhorado.

Palavras chave: células estromais mesenquimais; biorreator de ondas; Cellbag; biorreator de uso único, dispositivos descartáveis.

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are required by the scientific community in the development and enhancement of therapeutic techniques in different fields of medicine. The MSCs are present in small concentrations in tissues, which makes necessary the expansion *in vitro* for enable studies and therapeutic applicability. These are cells with high sensitivity to environmental conditions of cultivation. So, for increase productivity *in vitro* is used the technology of bioreactors in the development of processes in order to produce high cell densities in less time, with reduce use of resources and maintaining a safe operation. The new concepts of "disposable bioreactors", as the wave-induced motion bioreactor or Wave bioreactor, with possibility operating in a closed system, controlled and automated, reduced investment cost and operation, less risk of contamination, higher level biosecurity, added to the fact of being a underexplored technology and already approved by the FDA (Food and Drugs Administration) becomes a highly attractive alternative bioprocessing for cultivation of animal cells in large scale. In this context, the present work aims to develop a protocol for cultivation of MSCs in the Wave Bioreactor System 2/10. Experiments were performed to characterize the CEMs's culture behavior in the Wave bioreactor to obtain high cell productivity while maintaining the therapeutic potential of the CEMs. The experiments were carried out with 2 L Cellbag and Cultispher-S microcarrier with 300 ml of α -MEM medium culture supplemented with glucose, glutamine, and arginine and 15% v/v fetal bovine serum at 37 ° C and pH between 6,9-7,4. In the preliminary experiments it was verified that most of the inoculated cells did not adhere to the microcarriers. It was shown that such behavior is due to low relation between adhesion area (A_{MC} = total projected area of the microcarriers) and wet surface area of Cellbag ($A_{SMCellbag}$), which in the normal condition of operation results an adhesion between 25,7 and 61,7% of the inoculated cells. To solve the problem were performed experiments reducing $A_{Cellbag}$ which enabled improvements in cell adhesion by up to 100%. It was also found low performance of the cell expansion phase, presumably linked to operational problems like: microcarriers segregation in certain regions of the bioreactor causing depletion of nutrients, formation of aggregates of MCs colonized with cells and adhesion of MCs to Cellbag. In addition, it was observed that reducing CEM/MC ratio at the start of the culture, the cell expansion factor could be increased to values equal to or greater than 10. These results show that the Wave bioreactor has good potential for expansion of MSCs and that the same can be improved.

Keywords: mesenchymal stromal cells; wave-induced motion bioreactor; Cellbag; single use bioreactor, disposable devices.

ABREVIATURAS E SIGLAS

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CEMs: Células Estromais Mesenquimais

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FDA: Food and Drug Administration

GMP: Good Manufacturing Practice

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

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

hpMSC: human placental Mesenchymal Stem Cells

LATECC: Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular (DEQ - UFSCar)

MA: microesfera de alginato de cálcio

MC: microcarregador

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

PBS: Solução Tampão de fosfato (Phosphate Buffer Saline)

SFB: Soro Fetal Bovino

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

SUS: Sistema de Uso Único

wt-hMSC: Linhagem primária (wt - wild type) human Mesenchymal Stem Cells

α -MEM: Minimum Essential Medium

SÍMBOLOS

μ : velocidade de crescimento celular

$A_{MC}/A_{SMCellbag}$: relação entre área total projetada dos microcarregadores e área da superfície molhada da Cellbag

A_{MC} : área total projetada dos microcarregadores

arg: arginina

$A_{SMCellbag}$: área da superfície molhada da Cellbag

B: largura da Cellbag

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

cel/mL: célula/mL

FE: Fator de expansão celular

glc: glicose

gln: glutamina

h: altura de líquido na Cellbag

k: velocidade de agitação da plataforma

lac: lactato

N_{cel}/N_{MC} : número de células/número de microcarregadores

NH_3 : amônia

Re_{mod} : Número de Reynolds modificado

t_d : Tempo de duplicação celular

V: volume de operação

v: viscosidade cinemática

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
ABREVIATURAS E SIGLAS	x
SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xix
1. Introdução	21
2. Revisão bibliográfica.....	24
2.1. Células Estromais Mesenquimais (CEMs)	24
2.2. Cultivo de células animais <i>in vitro</i>	25
2.2.1. Crescimento e metabolismo das células animais cultivadas <i>in vitro</i>	26
2.2.2. Fatores relacionados ao cultivo de células animais	28
2.2.3. Meio de cultivo	30
2.2.4. Estruturas de adesão para cultivo de células dependentes de ancoramento	31
2.3. Microesferas de Alginato de Cálcio (MA)	33
2.4. Tecnologias empregadas para expansão de células animais <i>in vitro</i>	34
Biorreatores	34
1. Biorreator spinner e biorreator tipo tanque agitado	35
2. Biorreator de parede rotativa.....	36
3. Biorreator de leito fixo e leito fluidizado	36
4. Biorreator de fibras ocas.....	36
5. Biorreator de ondas – Sistema de Uso Único.....	38
2.5. Aplicação do biorreator Wave no cultivo de células dependentes de ancoramento ...	42
2.6. Considerações a respeito da revisão bibliográfica	43
3. Objetivos	44
3.1. Objetivo geral.....	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. Material e Métodos.....	45
1. Preservação das CEMs	45
2. Descongelamento e ativação das CEMs.....	45
3. Preparo dos microcarregadores	45
4. Preparo do inóculo	46
5. Operação do biorreator Wave e tratamento da amostra	47

6.	Determinação da densidade e viabilidade celular	49
7.	Análise de recuperação celular.....	49
8.	Quantificação de células viáveis pelo método do MTT	49
9.	Metodologias de cálculo.....	50
10.	Análise de glicose, glutamina e lactato	51
11.	Análise de aminoácidos	51
12.	Análise de amônia.....	51
13.	Redução da área de superfície molhada da Cellbag	52
14.	Adição de microesferas de alginato de cálcio	55
15.	Sistema de vibração.....	56
16.	Relação de experimentos realizados	58
5.	Resultados	59
5.1.	Análise das características de inoculação e operação.....	59
	Experimento 1	59
	Experimento 2	61
5.2.	Análise da fase de adesão.....	63
	Experimento 3	64
	Experimento 4	65
5.3.	Estratégias para elevar o fator de expansão celular: Cellbag com área de superfície molhada reduzida durante todo o cultivo - Adição de microesferas de alginato - Aplicação do aditivo Anti-Clumping	69
	Experimento 5	69
	Experimento 6	71
	Experimento 7	75
5.4.	Avaliação dos resultados obtidos no controle de pH, aperfeiçoamento da fase de adesão e da fase de crescimento.....	79
6.	Conclusões	85
7.	Sugestões para trabalhos futuros.....	87
	Referências	88
	Apêndice 1. Curva padrão da análise de células viáveis pelo método MTT para os experimentos realizados.....	94
	Apêndice 2. Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma; pH; porcentagem de CO ₂ na entrada de gás da Cellbag; concentração de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia; número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão para os experimentos realizados.	97
	Apêndice 3. Tabelas com as concentrações de aminoácidos para os experimentos realizados.	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo simplificado de diferenciação das células estromais mesenquimais.....	24
Figura 2 – Resumo dos fatores relacionados ao metabolismo celular.	26
Figura 3 - Fases típicas do cultivo de células animais.	27
Figura 4 – Simplificação das vias metabólicas de consumo de glicose e glutamina e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. 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 cetoglutarato.....	28
Figura 5 – Intervalos de concentração celular de acordo com modelo de biorreator e modo de operação para cultivo de células animais.	35
Figura 6 – Modelos de biorreatores aplicados no cultivo de células animais. A1 - spinner, A2 - tanque agitado, B - parede rotativa, C1 - leito fixo, C2 - leito fluidizado, D - fibras ocas. Dimensões sem correspondência com a dimensão original.	37
Figura 7 – Biorreator Wave TM – Sistema 2/10. Plataforma de operação com módulo de perfusão e Cellbag TM (A); módulo de controle Wavepod TM II Integrated Controller (B).....	39
Figura 8 – A: Zonas de transição do regime laminar para o regime turbulento para Cellbags com diferentes capacidades. B: Valores de Re_{mod} em relação ao volume operacional para Cellbags com diferentes capacidades operando com velocidade de agitação de 18 rpm e ângulo de inclinação de 8° ($V_{máximo}$: volume operacional máximo).....	41
Figura 9 – Potência específica inserida de acordo com a velocidade de agitação plataforma para Cellbag de 2 L operando com 0,2 e 1 L com ângulo de inclinação da plataforma de 7 e 10°.....	42
Figura 10 – Esquema das etapas envolvidas no preparo do inóculo utilizado nos experimentos de cultivo no biorreator Wave.....	46
Figura 11 – Esquema resumido dos procedimentos de inoculação para os experimentos realizados no biorreator Wave.....	47
Figura 12 – Procedimento de tratamento das amostras retiradas da Cellbag durante os experimentos de cultivo da linhagem hMSC-TERT.....	48
Figura 13 – Biorreator Wave TM utilizado nos experimentos de cultivo da linhagem hMSC-TERT: Plataforma 2/10 e Módulo de Controle Wavepod TM II.....	48
Figura 14 – A1: Vista lateral da plataforma de operação com apoios colocados nas laterais; A2: Vista superior da plataforma de operação com apoios laterais; B1: Vista lateral da plataforma com a Cellbag em posição normal de operação; B2: Vista lateral da plataforma com a Cellbag restringida pelos apoios laterais. Nomenclatura: AE - apoio lateral esquerdo; AD - apoio lateral direito.	53

Figura 15 – (a) Cellbag em posição normal de operação; (b) Cellbag com apoios laterais para aumentar a relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$; (c) Esquema representativo das áreas de superfície molhada da Cellbag. Onde: A1: área normal de operação para volume de trabalho de 300 mL (Experimentos 1 e 2); A2 (Experimento 3) e A3 (Experimentos 4, 5, 6 e 7): áreas de operação com o líquido restringido por apoios laterais colocados na plataforma.....	54
Figura 16 – Esquema do procedimento empregado para a produção das microesferas de alginato de cálcio. A solução de alginato foi colocada em um recipiente com spray e então borrifada com distância de 10 cm do recipiente com solução de cloreto de cálcio. Após, as microesferas formadas foram separadas por peneiras com diâmetro de malha de 250 e 125 μm	55
Figura 17 – Microesferas de alginato de cálcio com diâmetro entre 125 - 250 μm . Magnificação de 100x.....	56
Figura 18 - Sistema de vibração desenvolvido para ser acoplado à parte superior da Cellbag a fim de gerar vibrações que auxiliem na movimentação dos microcarregadores. Desenho e desenvolvimento: Ricky Nelson Burgos Gavelán. Estudante de doutorado em física. DF/UFSCar.....	57
Figura 19 - Cellbag com sistema de vibração acoplado. Em detalhe os motores de vibração colocados na parte superior da Cellbag.	57
Figura 20 - Experimento 1 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10%v/v), SFB (15% v/v) e 15 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de meio de cultivo entre 48 e 192 h (indicado por setas azuis). Volumes adicionados: 50 mL em 48 - 120 h, 75 mL em 144h, 50 mL em 168 h e 45 mL em 192h. A agitação da plataforma foi mantida em 2 rpm e 2° até 24h de operação, passando para 10 rpm e 4° após 96 h de operação.	60
Figura 21 - Experimento 2 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10%v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de 25 mL de meio de cultivo com 96 h (indicado por seta). A agitação da plataforma foi mantida em 2 rpm e 2° até 24h de operação, passando para 5 rpm e 5° após 96 h de operação. A agitação menor acarretou na adesão dos microcarregadores na Cellbag com 72 h de operação.....	62
Figura 22 - Deposição de microcarregadores na Cellbag com 72 h de cultivo no Experimento 2.	63
Figura 23 - Experimento 3 – Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10%v/v), SFB (15%	

v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de 30 mL de meio de cultivo com 72 h (indicado por seta). A agitação da plataforma foi de 4 rpm e 2° nas primeiras 4 h de operação, passando para 7 rpm e 4° após 24 e a 10 rpm e 4° após 72 h.	65
Figura 24 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica para o Experimento 3 (a) e Experimento 4 (b) no fim da fase de adesão e Experimento 3 (c) e Experimento 4 (d) com 24 h de operação. Magnificação de 100x.	67
Figura 25 - Experimento 4 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de meio de cultivo com 96 e 120 h (indicado por seta). A agitação da plataforma foi de 5 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 5° após 24 h e de 9 rpm e 5° após 72 h.	68
Figura 26 - Experimento 5 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de 25 mL de meio de cultivo concentrado (4 vezes concentrado comparado ao meio inoculado) com 72, 96, 144 e 168 h (indicado por seta). A plataforma foi mantida durante todo o cultivo com área de superfície molhada reduzida. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 2° até 96 h, 10 rpm e 4° até 48 h, passando para 14 rpm e 8°.	70
Figura 27 - Experimento 5 - Imagem dos microcarregadores no fundo da cellbag com 144 h. Em destaque a formação de aglomerados de microcarregadores.	71
Figura 28 – Imagens dos microcarregadores e das microsferas de alginato (em detalhe) obtidas por microscopia ótica para o Experimento 6. Magnificação de 200x.	71
Figura 29 - Experimento 6 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Adição de MA em relação 1:1 ao número de partículas de MCs com 29 h (seta vermelha). Operado com adição de meio de cultivo concentrado (3 vezes concentrado comparado ao meio inoculado) com 72 h (seta azul). A plataforma foi mantida durante todo o cultivo com área de superfície molhada reduzida. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 2° até 24 h, 10 rpm e 4° até 48 h, passando para 14 rpm e 8°.	73
Figura 30 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica para o Experimento 6 com 24 h de operação. Magnificação de 100x.	74
Figura 31 - Experimento 6 - Imagem dos microcarregadores no fundo da cellbag com 48 h. Em destaque os microcarregadores aglomerados na região central da Cellbag.	74

Figura 32 - Experimento 7 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de meio de cultivo concentrado com Anti-Clumping (3 vezes concentrado comparado ao meio inoculado) com 29 h (seta vermelha). Adição de meio de cultivo não concentrado e sem Anti-Clumping com 144 h (seta azul). A plataforma foi mantida durante todo o cultivo com área de superfície molhada reduzida. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 5° e ao máximo de 14 rpm e 8° após 48 h.....	76
Figura 33 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica no fim da fase de adesão no Experimento 7. Magnificação de 100x.	77
Figura 34 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica com 48 h de operação no Experimento 7 (após a adição de Anti-Clumping). Magnificação de 100x.....	78
Figura 35 - Experimento 7 - Imagem dos microcarregadores dispersados no fundo da cellbag com 72 h de operação.....	78
Figura 36 - Variação do pH nos cultivos realizados. E1: cultivo com meio suplementado com 15 mM de bicarbonato de sódio e adição de meio entre 48 e 192 h. E2, E3, E4, E5, E6 e E7: cultivos com meio suplementado com 24 mM de bicarbonato de sódio e adição de meio: E2 com 96 h, E3 com 72 h, E4 com 96 e 120 h, E5 com 72, 96, 144 e 168 h, E6 com 29 e 72 h, E7 com 29 e 144 h.	79
Figura 37 – Percentual de células aderidas aos microcarregadores nos cultivos realizados, tendo como base o número de células inoculadas. E1 e E2 com relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 0,77, E3 com relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 3,07 e E4, E5, E6 e E7 com relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 1,27.....	80
Figura 38 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica no fim da fase de adesão para: E1 (a), E2 (b), E3 (c), E4 (d), E5 (e), E6 (f) e E7 (g). Magnificação de 100x.....	81
Figura 39 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 1. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 24753$), com coeficiente de correlação de 0,991.	94
Figura 40 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 2. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 19754$), com coeficiente de correlação de 0,996.	94
Figura 41 – Curva padrão da análise de MTT – Experimentos 3 e 4. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 32628$), com coeficiente de correlação de 0,998.	95

Figura 42 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 5. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 45982$), com coeficiente de correlação de 0,995.....95

Figura 43 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 6. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 1E6$ e $b = 44141$), com coeficiente de correlação de 0,997.....96

Figura 44 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 7. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 90752$), com coeficiente de correlação de 0,995.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados da relação entre área de adesão e área de superfície molhada da Cellbag para os experimentos realizados.....	52
Tabela 2 – Relação dos experimentos realizados neste trabalho e condições de operação.....	58
Tabela 3 – Resumo de condições utilizadas e resultados obtidos no conjunto de experimentos realizados neste trabalho.....	83
Tabela 4 – Experimento 1 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.....	97
Tabela 5 – Experimento 1 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.....	97
Tabela 6 – Experimento 1 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO ₂ da atmosfera do meio de cultivo	98
Tabela 7 – Experimento 2 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.....	98
Tabela 8 – Experimento 2 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.....	98
Tabela 9 – Experimento 2 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO ₂ da atmosfera do meio de cultivo	99
Tabela 10 – Experimento 3 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.....	99
Tabela 11 – Experimento 3 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.....	99
Tabela 12 – Experimento 3 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO ₂ da atmosfera do meio de cultivo	100
Tabela 13 – Experimento 4 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.....	100
Tabela 14 – Experimento 4 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.....	100
Tabela 15 – Experimento 4 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO ₂ da atmosfera do meio de cultivo	101
Tabela 16 – Experimento 5 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.....	101
Tabela 17 – Experimento 5 - Dados de glicose, arginina, lactato e amônia.....	101
Tabela 18 – Experimento 5 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO ₂ da atmosfera do meio de cultivo	102
Tabela 19 – Experimento 6 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.....	102
Tabela 20 – Experimento 6 - Dados de glicose, arginina, lactato e amônia.....	102

Tabela 21 – Experimento 6 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO ₂ da atmosfera do meio de cultivo	103
Tabela 22 – Experimento 7 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.	103
Tabela 23 – Experimento 7 - Dados de glicose, arginina, lactato e amônia.	103
Tabela 24 – Experimento 7 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO ₂ da atmosfera do meio de cultivo	104
Tabela 25 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 1.	105
Tabela 26 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 2.	106
Tabela 27 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 3.	107
Tabela 28 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 4.	108
Tabela 29 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 5.	109
Tabela 30 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 6.	110
Tabela 31 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 7.	111

1. Introdução

A busca para o tratamento de doenças que ainda não apresentam procedimentos clínicos eficientes e com garantia de cura nas áreas de cardiologia, neurologia e imunologia, está impulsionando a pesquisa científica com células estromais mesenquimais (CEMs) (Malgieri et al., 2010). O número de publicações que mencionam o termo “mesenchymal stem cells” elevou perceptivelmente na última década (Shen, 2013), o que evidencia o intenso interesse pelo desenvolvimento de novas técnicas de tratamento fazendo uso das potencialidades das CEMs. Os primeiros estudos acerca da aplicação terapêutica das células estromais ocorreram na década de 80 (Fuchs, 2012). A aplicação das CEMs para tratamento de enfermidades nas áreas clínicas citadas está relacionada à sua capacidade de auto-renovação e de diferenciação *in vitro* em células especializadas (Fuchs, 2012) e ao potencial de regeneração de tecidos afetados devido à característica de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Plackek et al., 2009) e também à liberação de fatores bioativos ao microambiente lesado (Caplan, A. 2007). Além disso, a aplicação de terapias com CEMs não envolve limitações de caráter ético, como no caso do emprego de células embrionárias.

As CEMs são encontradas em diferentes tecidos, sendo a medula óssea a principal fonte (Plackek et al., 2009), contudo, as CEMs são obtidas em quantidades ínfimas (da Silva et al. 2003). Para cada 10^6 células aspiradas da medula óssea, entre 10 - 100 são CEMs (Kasten et al., 2008). Assim, para obter-se as doses clínicas necessárias é preciso um longo período de cultivo, acarretando em alto número de intervenções de operadores e grande demanda de recursos (dos Santos et al., 2013). Para que a pesquisa científica visando o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento envolvendo CEMs se desenvolva e a aplicação terapêutica seja possível, é necessário o aumento da produção dessas células em sistemas de cultivo seguros e eficientes.

As CEMs são células que para expandirem necessitam de uma superfície para adesão e são extremamente sensíveis às condições de cultivo. A própria CEM trata-se do produto de interesse, assim deve haver cuidado com o processo de cultivo para que essa célula não sofra alterações que tornem a aplicação terapêutica não confiável. No desenvolvimento de processos para aumento de escala de produção, as sucessivas etapas de subcultura, 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).

1. INTRODUÇÃO

Segundo dos Santos et al. (2013), os avanços na produção de CEMs em larga escala através de processos com aval de agências reguladoras estão relacionados à aplicação de operações de cultivo em sistemas fechados com biorreatores descartáveis.

As células animais apresentam tempo de duplicação (t_d) entre 15 e 25 h durante a fase exponencial, o que torna o cultivo suscetível à contaminação por outros organismos como bactérias, que apresentam tempo de duplicação de cerca de 30 min (Butler, 2004). Técnicas de assepsia devem ser empregadas durante todo o processo de cultivo celular, assim como cuidado meticuloso durante a preparação do meio de cultura e esterilização dos materiais utilizados.

A aplicabilidade de um protocolo de cultivo em centros de estudo e pesquisa depende da eficiência do processo, e que este seja reprodutível e seguro. A utilização de biorreatores descartáveis pré-esterilizados com radiação γ (Sistemas de Uso Único - SUS, *Syngle use Systems*) é uma vertente já presente nos processos de cultivo de biofármacos e trata-se de uma nova expectativa para cultivo de células animais visando fins de pesquisa e terapêuticos (Eibl et al., 2009). Os processos que aplicam biorreatores do modelo SUS não necessitam dos certificados de limpeza e esterilização *in situ* (cleaning in place - CIP e sterilization in place - SIP). Como não utilizam os processos tradicionais e demorados de esterilização com vapor, esses sistemas reduzem o tempo de processamento e facilitam a aprovação de protocolos de cultivo pelas agências reguladoras. 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 de sistemas de uso único não requer linhas de tubulação de vapor e água. Essas características implicam na redução do capital investido em até 40% comparado aos sistemas tradicionais (WEBER, et al. 2001). De acordo com trabalho apresentado por Rawlings; Pora (2009), os 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.

O biorreator Wave é um exemplo desses novos modelos de biorreatores descartáveis. Apresentado no fim da década de 90, trata-se de 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). Contudo, com relação ao cultivo de células microbianas, a elevada demanda de oxigênio requerida por essas células não é suprida pelo movimento de agitação (Brecht, 2009; Mikola

1. INTRODUÇÃO

et al., 2007). Nesse sentido, o modelo de agitação com ondas é aplicável no caso de células microbianas com baixa demanda por oxigênio, como o caso da linhagem *E. coli* anaeróbia facultativa cultivada em Cellbag de 120 L para fim terapêutico obtendo concentrações celulares de 7×10^8 - 1×10^9 cel/mL e concentração de produto entre 30 - 40 mg/L (Eibl et al., 2009). Para cultivos com elevada densidade celular e consumo de oxigênio é necessário elaborar modificações no layout da Cellbag, como acoplamento de sistema de aeração, (Eibl et al., 2009; Mikola et al., 2007).

O biorreator Wave é constituído por sistema com plataforma de operação que induz movimento de ondas no fluido presente na Cellbag. A Cellbag trata-se de uma bolsa de plástico descartável e pré-esterilizada onde as células são cultivadas. Apresenta portas de conexão que possibilitam a manipulação fora da câmara de fluxo laminar. As informações na literatura sobre o cultivo de CEMs no biorreator Wave são escassas (dos Santos et al., 2013), sendo que trabalhos disponibilizados não fornecem informações detalhadas acerca de procedimentos operacionais e problemas encontrados (Akerström, 2009; Timmins et al., 2012).

Nesse contexto, o desenvolvimento de processos de cultivo das CEMs no biorreator Wave apresenta grande relevância para a utilização da Engenharia de Bioprocessos na viabilização de uso dessas células em aplicações inovadoras de terapia celular. Assim, o presente trabalho propõe a avaliação de um processo de cultivo utilizando a plataforma tecnológica Wave com o intuito de verificar seu potencial na expansão em larga escala (aplicação em escala clínica) de CEMs com qualidade apropriada para uso clínico.

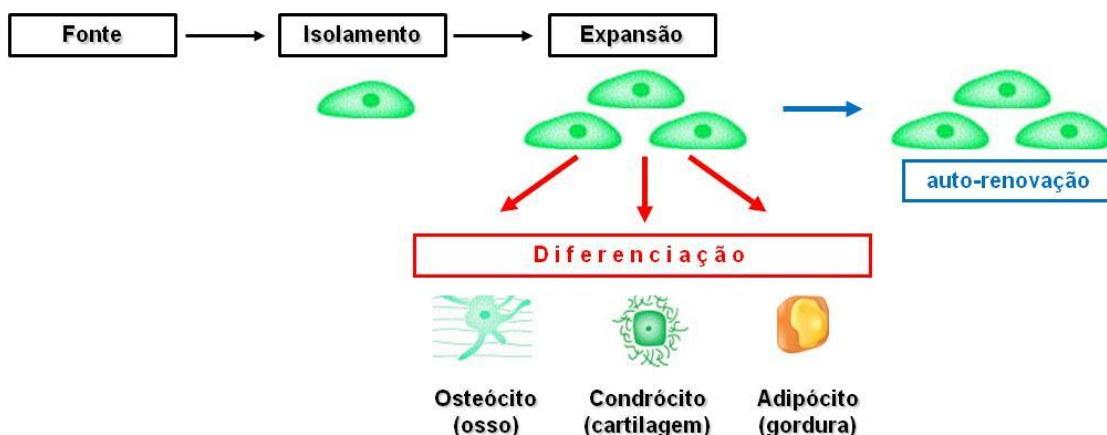
2. Revisão bibliográfica

2.1. Células Estromais Mesenquimais (CEMs)

Com relação ao potencial de diferenciação em tipos celulares, as células podem ser divididas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células do zigoto são consideradas totipotentes pelo 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 e com capacidade de diferenciação mais limitada comparada às células tronco embrionárias (Butler, 2004). As células tronco adultas presentes na medula óssea são divididas em dois grupos: células hematopoiéticas (células sanguíneas) e células não hematopoiéticas (Células Estromais Mesenquimais - CEMs).

As células estromais mesenquimais (CEMs) são encontradas principalmente na porção aderente da medula óssea. Correspondem à porção não hematopoiética e encontram-se associadas às células sanguíneas. São células multipotentes com capacidade de auto-renovação e diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Nirmalanandhan; Sittampalam, 2009) (Figura 1). Trata-se de um tipo celular visado pela comunidade científica por apresentar potencial de cultivo *in vitro* mantendo a capacidade de diferenciação (Arrieta; Silberstein, 2011) e por não envolver questões de caráter ético.

Figura 1 – Processo simplificado de diferenciação das células estromais mesenquimais.



Adaptado de Caplan e Bruder (2001).

De modo geral, a dosagem terapêutica gira em torno de $1,4 \times 10^6$ células por kg do paciente (Le Blanc, et al., 2008). Como poucas células são obtidas do doador, para ser

possível empregar as CEMs em estudos clínicos e em terapia celular é necessário aumentar a produção *ex vivo* (da Silva et al. 2003).

A capacidade de subcultura (passagem) das CEMs 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 e Kassem, 2008). Deve-se ter atenção com relação ao número de passagens, pois a morfologia celular e características funcionais sofrem alterações ao longo dos processos de subcultura (Freshney, 1994).

As células animais apresentam número limite de divisões devido ao encurtamento dos telômeros, capas de proteção localizadas nas extremidades dos cromossomos, após cada divisão mitótica (Butler, 2004). Quando a capacidade de divisão é atingida, a célula entra em estado de senescência. Em estudos *in vitro* as células empregadas são provenientes de linhagem primária que passou por processo de imortalização, passando a ser linhagem contínua e denominadas células imortalizadas por apresentarem potencial infinito de subdivisões. O processo de imortalização é feito a partir da sobre-expressão da enzima telomerase que atua estendendo a capacidade de divisão celular (Abdallah et al., 2005)

Ao final do processo de expansão *in vitro* é necessário assegurar-se que as CEMs continuam mantendo a potencialidade terapêutica e não sofreram mudanças em seus marcadores de superfície. Segundo exposto por Dominici et al. (2006), utiliza-se três critérios para identificação das CEMs:

1. Ser aderente ao plástico em condições padrão de cultivo.
2. Apresentar diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos.
3. Apresentar resposta positiva e negativa para marcadores de superfície específicos. Deve apresentar marcadores de superfície positivos: CD105, CD73 e CD90. E marcadores negativos: CD45, CD34, CD14, CD11_b, CD79_a, CD19, HLA-DR (Ratajczak et al., 2008).

2.2. Cultivo de células animais *in vitro*

Apesar da evolução nas técnicas de cultivo de células *in vitro*, o ambiente ao qual as células são expostas no cultivo ainda está longe de representar o ambiente *in vivo*. As interações célula - célula e célula - matriz extracelular, estrutura do citoesqueleto, assim como a presença de hormônios e fatores de sinalização celular sofrem alterações no cultivo *in vitro*, o que acaba por desregular o metabolismo celular e dificultar o controle do processo. Além disso, as células animais não possuem parede celular, o que as tornam extremamente sensíveis

aos estímulos mecânicos gerados no ambiente onde estão expostas (Shuler e Kargi, 2010). A Figura 2 expõe de forma simplificada os fatores envolvidos no metabolismo celular. Dessa forma, torna-se vital o controle das condições de cultivo para ter-se um processo eficiente.

Com o propósito de manter as características das células *in vitro* mais fidedignas ao ambiente *in vivo* e desenvolver um processo que favoreça o objetivo do cultivo deve-se conhecer as necessidades específicas da célula em estudo e então fazer uso das possibilidades de controle e manipulação dos parâmetros físicos e químicos do ambiente de cultivo. Assim, compreender e controlar a proliferação e diferenciação do cultivo requer a compreensão de diversos fatores, tais como fatores cinéticos, constituição do meio de cultivo, composição da atmosfera de cultivo, interações célula-célula e célula-ambiente (Rodrigues et al., 2011).

Nesse contexto, Hewitt et al. (2011) afirmam que para desenvolver estratégias de processo com altos níveis de expansão e controle de qualidade, o entendimento com relação ao ambiente de cultivo deve ser o mais detalhado possível.

Figura 2 – Resumo dos fatores relacionados ao metabolismo celular.



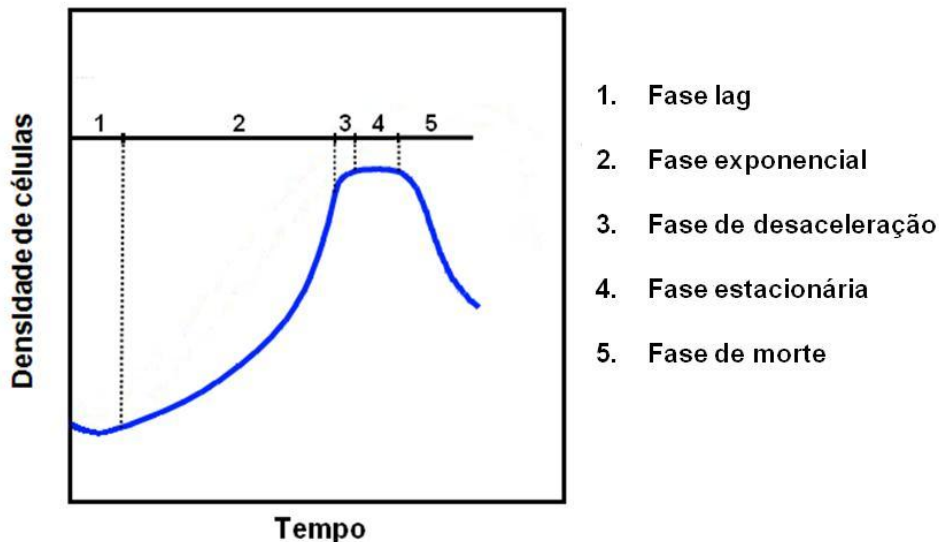
Adaptado de Eibl et al. (2009).

2.2.1. Crescimento e metabolismo das células animais cultivadas *in vitro*

O cultivo de células animais apresenta fases características, sendo elas a fase lag, fase de crescimento exponencial e fase estacionária seguida pela fase de declínio da viabilidade celular (Freshney, 1994) (Figura 3). O período de fase lag corresponde à fase inicial do cultivo e está relacionado à concentração do inóculo, cultivos inoculados com baixa densidade no inóculo apresentam uma fase lag maior. Trata-se de um período de adaptação das células às condições de cultivo, sendo liberado pelas mesmas fatores de crescimento que devem atingir um nível mínimo para que a fase de crescimento exponencial seja alcançada. Durante a fase de crescimento exponencial as células estão no máximo de sua capacidade metabólica, e apresentam a maior velocidade de crescimento. A 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. A 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).

Figura 3 - Fases típicas do cultivo de células animais.



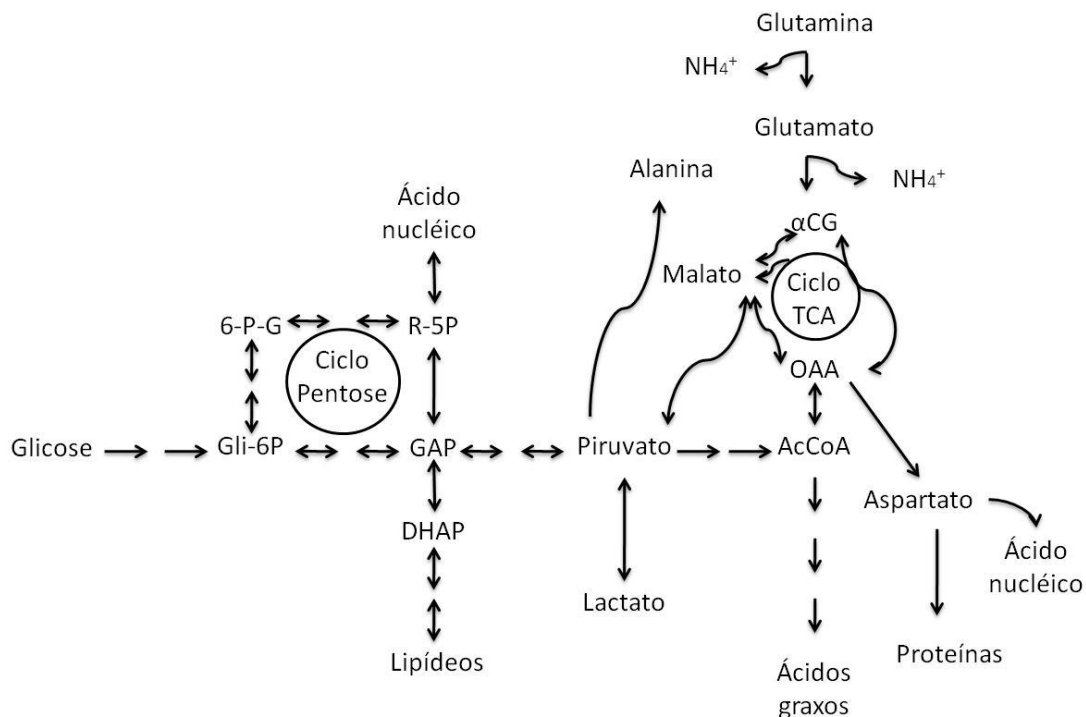
As células animais cultivadas *in vitro* apresentam alterações significativas nas funções metabólicas devido a serem adaptadas a um ambiente diferente do encontrado *in vivo*. O processo de imortalização da linhagem também resulta em interferência direta nas vias metabólicas (Moraes et al., 2008).

A célula em cultivo *in vitro* consome fontes de carbono, nitrogênio e energia em excesso, resultando em maior produção de metabólitos inibidores do crescimento celular vinculados às vias de consumo dessas fontes (MORAES et al., 2008). Em geral, glicose corresponde à principal fonte de carbono e energia às células e glutamina como fonte de nitrogênio e também de carbono em caso ausência de glicose. Lactato e amônia são os metabólitos com maior potencial de inibição do cultivo por ter como ação principal alterar o pH intracelular (Shuler e Kargi, 2010). Dentre as várias vias metabólicas necessária para o crescimento e manutenção celular, destaca-se as vias de consumo de glicose e consumo de glutamina e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA).

De modo simplificado, a glicose é convertida em piruvato pela glicólise e também empregada para síntese de biomassa através da via pentose-fosfato. O piruvato é parcialmente convertido em CO₂ e água pelo 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 e Kargi, 2010). A Figura 4 apresenta as relações entre as vias metabólicas de consumo de glicose e glutamina e o ciclo TCA.

Figura 4 – Simplificação das vias metabólicas de consumo de glicose e glutamina e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. 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 e Kargi (2010).

2.2.2. Fatores relacionados ao cultivo de células animais

2.2.2.1. Concentração de Oxigênio

Os principais componentes da atmosfera de cultivo são oxigênio e dióxido de carbono (Freshney, 1994). Com relação ao teor de oxigênio aplicado, esse valor varia de acordo com a origem da cultura de células e a densidade do cultivo. As células animais consomem menos oxigênio que células de plantas e células microbianas. Em geral, células animais requerem entre 0,06 e 0,2 x 10⁻¹² molO₂/(h.célula) (Shuler e Kargi, 2010). Elevada concentração de oxigênio no ambiente de cultivo pode promover a alteração de moléculas intracelulares, como proteínas, lipídeos e o material genético, o que inviabiliza o crescimento celular, podendo provocar a morte da célula (Zeng e Bi, 2006). As CEMs por serem

originárias do estroma da medula óssea estão expostas a baixa concentração de oxigênio, entre 4 e 7% (GRANT e SMITH, 1963), o que torna aconselhável o cultivo em condições de hipóxia (Schop, 2010).

2.2.2.2. pH

Como há liberação no meio de cultivo de dióxido de carbono metabólito e produção de ácido lático, torna-se necessário o controle do pH. Em geral, o pH aplicado no cultivo de células animais é de 7,4, sendo que esse valor difere dependendo da linhagem celular, com faixas entre 7,0 a 7,4 e 7,4 a 7,7 (Freshney, 1994). O acompanhamento da variação do pH é usualmente realizado pela adição de vermelho de fenol ao meio de cultivo. Esse componente faz com que o meio de cultivo apresente mudança de coloração bem definida para específicos valores de pH. Contudo, a adição de vermelho de fenol interfere nas medidas de fluorescência e absorvância.

A tensão de dióxido de carbono na atmosfera atua no controle do pH do meio de cultura (Freshney, 1994). Em meios com adição de bicarbonato de sódio, o equilíbrio é descrito pelas Reações 1 e 2. Com o aumento da concentração de CO₂ dissolvido no meio, o equilíbrio da Reação 1 será deslocado para a direita, elevando a acidez do meio. Contudo, o aumento da concentração de bicarbonato irá deslocar o equilíbrio da Reação 2 para a esquerda até atingir o equilíbrio em pH 7,4. A pressão parcial de CO₂ aplicada na atmosfera de cultivo irá variar de acordo a concentração de agentes tamponantes adicionados ao meio de cultivo (como bicarbonato e HEPES).



Em situações de baixa concentração celular ou quando o cultivo encontra-se em fase lag, a produção de dióxido de carbono metabólito pode não ser suficiente para manter o equilíbrio em pH 7,4, sendo necessário um melhor controle no teor do CO₂ atmosférico.

2.2.2.3. Temperatura

A temperatura do ambiente de cultivo atua influenciando a taxa de crescimento celular e o pH do meio, pela variação da solubilidade do dióxido de carbono. O valor ideal varia de acordo com o ambiente *in vivo* de onde o cultivo é originado (Freshney, 1994), o ambiente de cultivo mantido a 37°C é considerado a condição ótima no cultivo de células animais (Butler, 2004).

2.2.2.4. *Osmolalidade*

Em geral, a osmolalidade aplicada no ambiente de cultivo tende a ser próxima à do ambiente original das células em trabalho. Para o cultivo de células humanas, por exemplo, o valor de referência aplicado é o do plasma sanguíneo (290 mOsm/L) (Waymouth, 1970). A adição de componentes ao meio de cultivo altera a osmolalidade original e requer cuidados para não entrar em condições danosas às células. Níveis elevados de osmolalidade (maiores que 400 mOsm/L) provocam a queda da capacidade de formação de colônias a partir de uma única célula (*plating efficiency*), enquanto que baixos níveis podem reduzir a velocidade de crescimento do cultivo (Butler, 2004).

2.2.2.5. *Viscosidade*

A viscosidade do meio de cultivo torna-se um importante fator no cultivo de células em suspensão, em especial em cultivos com baixo teor de soro sanguíneo (Freshney, 1994). Nessas condições, as células estão mais vulneráveis ao estresse provocado pela agitação do meio, e o aumento da viscosidade do líquido age como um parâmetro para proteção das células.

2.2.3. **Meio de cultivo**

O meio de cultivo a ser empregado deve apresentar constituição química tal que possa suprir as demandas metabólicas da célula, fornecendo os nutrientes necessários para as diversas rotas metabólicas e para composição estrutural (MORAES et al., 2008). Os meios de cultivo comerciais apresentam na sua composição, entre outros componentes, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, lipídeos e minerais. A concentração desses constituintes varia de acordo com o meio (MEM, EMEM, DMEM, entre outros). Conforme a necessidade do cultivo faz-se a suplementação do meio com os componentes desejados, como fonte de carboidrato, por exemplo. A suplementação com soro sanguíneo adiciona ao meio um conjunto de substâncias de grande importância para proteção e proliferação das células, assim como fatores de adesão, no caso de células dependentes de ancoramento. Adiciona-se soro sanguíneo na expansão de CEMs em concentrações de 10 a 20% v/v (Jung, S. et al. 2012).

A concentração de aminoácidos empregada varia de 0,1 a 0,2 mM, sendo que o aminoácido glutamina é adicionado entre 2 - 4 mM e glicose entre 10 - 25 mM. A osmolalidade dos meios de cultivo é de aproximadamente 300 mOsm/L. Bicarbonato é adicionado a fim de manter o pH do meio entre 6,9 e 7,4 quando em atmosfera entre 5 a 10%

de CO₂. O sistema bicarbonato-CO₂ apresenta a desvantagem de permitir que o meio se torne rapidamente alcalino quando retirado da incubadora. Para evitar esses problemas e também possibilitar o cultivo em atmosfera sem controle da concentração de CO₂, adiciona-se HEPES em concentrações de 10 a 20 mM. Para um controle visual do pH do meio de cultivo, adiciona-se vermelho de fenol (Butler, 2004).

A presença de componentes de origem animal eleva o risco com relação à segurança do produto final. Apesar da grande influência no melhor desempenho do cultivo, o emprego de soro sanguíneo está sendo evitado por este não apresentar formulação química bem definida, por ter variações entre lotes e ser uma potencial fonte de introdução de agentes adventícios, vírus, príons e também pela introdução de proteínas não especificadas, o que eleva a complexidade da etapa de purificação do produto (Shahdadfar, A. et al., 2005; Moraes et al., 2008). Tais fatos estão levando à normas mais rígidas para aprovação de processos pelas agências reguladoras e a conseqüente busca por parte de instituições de pesquisa pela gradativa redução e extinção do emprego de soro sanguíneo no processo de cultivo.

Os meios livres de soro sanguíneo apresentam na formulação substituintes de fatores de adesão, reguladores de crescimento e diferenciação, assim como hormônios (Freshney, 1994). A formulação é feita com compostos de alta purificação e composição conhecida, o que facilita a aprovação do processo pelas agências reguladoras, porém encarece o custo de produção (MORAES et al., 2008). Contudo, não é simples a adoção de meio de cultivo livre de soro. Torna-se necessário uma análise mais detalhada dos requerimentos metabólicos da célula, como também técnicas de cultivo com assepsia mais acurada e maiores cuidados com relação ao estresse das condições do ambiente sobre as células.

2.2.4. Estruturas de adesão para cultivo de células dependentes de ancoramento

2.2.4.1. Microcarregadores

O cultivo de células aderentes em microcarregadores (MCs) foi iniciado em torno de 1960. A elevada relação entre área superficial e volume do cultivo empregando microcarregadores permite obter maiores densidades celulares com menor uso de materiais de trabalho (Lubiniecki, 1990). Apresentam, em geral, forma esférica. O material com que o microcarregador é construído tem por objetivo propiciar melhor adesão e proliferação celular. Dentre os materiais empregados estão a celulose, dextrana, vidro, colágeno, gelatina. De acordo com a porosidade da matéria-prima base, os microcarregadores são classificados em microporosos ou macroporosos (MORAES et al., 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 contato 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 e Kargi, 2010). O crescimento no interior dos poros permite a proliferação das células em forma tridimensional, possibilitando melhor sinalização celular pela expressão de fatores de crescimento (MORAES et al., 2008).

Os microcarregadores microporosos com diâmetro entre 100 - 500 μm são tradicionalmente utilizados para cultura em suspensão. Os microcarregadores macroporosos, com diâmetros maiores, são empregados quando é necessária elevada velocidade de sedimentação, como nos biorreatores de leito fluidizado e leito fixo. Nos biorreatores de leito fluidizado o diâmetro dos MCs varia entre 0,6 - 1 mm e nos biorreatores de leito fixo o diâmetro dos MCs é na faixa de 3 - 5 mm para evitar o entupimento dos canais entre MCs.

Concentração inicial do inóculo no cultivo com microcarregadores

Para garantir alto fator de expansão celular e menor tempo em fase lag, a concentração inicial do inóculo deve estar na faixa entre 10^4 a 10^5 células/mL (Lubiniecki, 1990; Butler, 2004). A concentração usual de microcarregadores no início da operação varia de 1 à 3 gMC/L. A inoculação com altas concentrações de microcarregadores requer altas densidades celulares, dificultando o processo de agitação para manutenção de um ambiente homogêneo (Butler, 2004).

A razão entre o número de células inoculadas e o número de microcarregadores varia entre 2:1 a 30:1. Altas concentrações de microcarregadores exigem altas concentrações celulares a serem inoculadas, o que impossibilita o cultivo em batelada, já que é necessário realizar adição de meio de cultivo ao sistema. Para garantir que o encontro entre a célula e o microcarregador ocorra a fim de possibilitar uma adesão eficiente, recomenda-se que o volume inicial de trabalho corresponda a um terço do volume final. Também recomenda-se, para cultivo de pequena e média escala, que durante a fase de adesão o cultivo seja mantido na maior parte do tempo em modo estático, com períodos de agitação intermitente. Os microcarregadores devem ser inoculados antes das células para que os mesmos absorvam proteínas presentes no meio de cultivo a fim de facilitar a adesão (Lubiniecki, 1990).

Na inoculação deve-se garantir que cada microcarregador irá receber ao menos uma célula viável a fim de possibilitar a colonização de toda a área adicionada e reduzir o número de microcarregadores não colonizados adequadamente. A razão célula-microcarregador crítica para a maioria das linhagens celulares é de 7, o que garante menos de 5% de microcarregadores não colonizados (Butler, 2004).

2.2.4.2. Estruturas 3D (Scaffolds)

Os suportes 3D ou *scaffolds* proporcionam ambiente de cultivo que possibilita uma organização celular mais semelhante ao ambiente *in vivo*. O monitoramento com relação à formação e ao diâmetro de agregados deve ser eficiente para evitar a queda da viabilidade (dos Santos et al., 2013). Aprimorar esse modelo de estruturas é a chave para alavancar os estudos na área de engenharia de tecidos. As interações célula-célula e célula-matriz extracelular tornam-se mais realistas, resultando em uma configuração e metabolismo celular próximos à do tecido de origem e reduzindo as chances de imunorrejeição (Serra et al., 2010).

2.3. Microesferas de Alginato de Cálcio (MA)

As microesferas de alginato de cálcio são produzidas pelo gotejamento de solução de alginato de sódio em uma solução de cloreto de cálcio. As MA são biocompatíveis, o que viabiliza a aplicação no cultivo de células. As MA tem sido estudadas para aplicação em procedimentos de encapsulamento de células para reduzir o problema da formação de aglomerados (Schaffer et al., 2012) e para encapsulamento de medicamentos que devem ser liberados no organismo de forma gradual (Khandai et al., 2012). Deve-se ter cuidado ao aplicar em culturas onde as células produzem ácidos orgânicos, como lactato, e quando há presença de íons fosfato ou agentes tamponantes que podem competir com o cálcio da ligação cálcio-alginato (Eibl et al., 2009).

Estudos realizados no LATECC demonstraram que as CEMs não aderem às microesferas de alginato de cálcio e que não ocorre interferência das MA com os microcarregadores Cultispher-S (Mendonça, 2013; Luna, 2014). A aplicação das MA como alternativa para retardar a formação de aglomerados de MCs se mostrou eficiente quando utilizado 50% de partículas de MA em relação ao número de partículas de MC inoculados (Mendonça, 2013).

2.4. Tecnologias empregadas para expansão de células animais *in vitro*

As informações a respeito do comportamento metabólico do cultivo, juntamente com a possibilidade de controle de parâmetros físicos e químicos inseridos no meio permitem aplicar e aperfeiçoar técnicas existentes, assim como elaborar processos diferenciados. A composição do meio de cultivo e regimes de operação constituem a base para o desenvolvimento de processos, aos quais se deve fazer aprimoramentos para chegar-se em um nível de operação segura, com aplicabilidade e viabilidade econômica.

Biorreatores

Durante o processo, monitorar o consumo de nutrientes e produção de metabólitos tóxicos permite o desenvolvimento de modelo correlacionando o consumo com produção e crescimento, com dados de viabilidade do cultivo. Para o desenvolvimento efetivo do processo torna-se necessário reconhecer os parâmetros chave de cultivo e estabelecer a melhor forma de realizar o controle do processo (Rodrigues et al., 2011).

Lim et al. (2007) expõe que a proliferação e diferenciação do cultivo está em função da manipulação de principais parâmetros do processo, que são o controle do ambiente físico-químico, concentração de nutrientes e metabólitos e presença de fatores de crescimento. Nesse contexto, de acordo com Shuler e Kargi (2010), os biorreatores destinados ao cultivo de células animais devem apresentar características tais que possibilitem:

- Adequada aeração e agitação sem causar danos à estrutura celular.
- Sistema eficiente de controle de parâmetros de cultivo e manutenção de ambiente homogêneo.
- Sistema eficiente na capacidade de remoção de substâncias tóxicas juntamente com potencial de elevada concentração do produto desejado.
- No cultivo de células dependentes de ancoramento, o biorreator deve ser capaz de operar de forma eficiente com o sistema de adesão (microcarregadores, *scaffolds*), mantendo a capacidade de controle e o ambiente de cultivo homogêneo em todos os pontos (interior das estruturas de adesão).

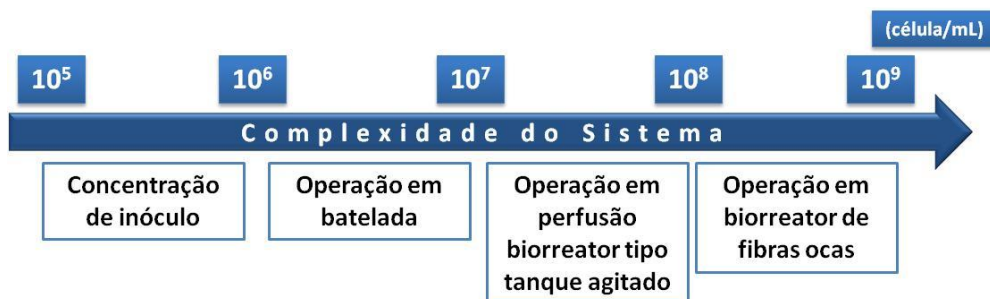
Estudos acerca do cultivo de CEMs em biorreatores apresentam técnicas relacionadas ao processo de adesão aos microcarregadores, redução do uso de soro, estratégias de alimentação visando reduzir o tempo de cultivo e elevar o fator de expansão (Eibes et al., 2010; Hewitt et al., 2011). Com relação às estratégias de alimentação, determinados modelos de biorreatores permitem aplicar diferentes regimes de operação O

estudo da melhor forma de introduzir nutrientes no ambiente de cultivo assim como retirar o meio saturado (incluindo células, metabólitos tóxicos e fatores de sinalização celular) possibilita tornar o cultivo mais eficiente, aprimorando o metabolismo celular (Serra et al., 2010).

Na literatura tem-se registrado para as CEMs, cultivadas com MC CultispherS com troca de 25 % do meio, valores de expansão celular entre 8 e 14 vezes (Eibes, 2010; dos Santos, 2011). Nas pesquisas realizadas no LATECC, em biorreator spinner com volume de cultivo de 50 mL e operado com troca de 50% do meio a partir de 48 h de cultivo tem-se registrado expansão das CEMs de 13 vezes com 11 dias de cultivo em meio α -MEM suplementado com 15% v/v de SFB (Luna, 2014).

A Figura 5 apresenta de forma geral o intervalo de densidade celular obtido dado modelo de biorreator e modo de operação empregado. Para obter densidade celular elevada é necessário aplicação de sistemas de operação mais complexos. Os principais biorreatores para cultivo de células animais estão listados a seguir.

Figura 5 – Intervalos de concentração celular de acordo com modelo de biorreator e modo de operação para cultivo de células animais.



Adaptado de MORAES et al. (2008).

1. Biorreator spinner e biorreator tipo tanque agitado

O biorreator spinner (Figura 6-A1) trata-se de um modelo de biorreator tipo tanque agitado para aplicação em escala de bancada. O modelo tipo tanque agitado (Figura 6-A2) apresenta design simples, com sistema operação e amostragem acessíveis (Rodrigues et al., 2011). Esse modelo de biorreator pode ser operado em diferentes regimes de alimentação. Em geral, a oxigenação é realizada através do borbulhamento de gás na parte inferior do tanque. O volume destinado ao meio de cultivo corresponde entre 70 a 80% do volume do biorreator (Eibl et al., 2009). Existem reatores com volume de trabalho de 20.000 L (MORAES et al., 2008). Contudo, quando maior a escala de trabalho, os processos de

agitação e aeração tornam-se mais complicados, assim como a garantia de assepsia do processo.

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. 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 levar a modificações na fisiologia que induzam morte por apoptose (Shuler e Kargi, 2010).

2. Biorreator de parede rotativa

Os biorreatores de parede rotativa (Figura 6-B) são girados ao longo do eixo axial. As células aderem às paredes do biorreator, estando expostas ao meio de cultivo por 25% do tempo, e no restante do tempo estão em contato direto com a fase gasosa (Shuler e Kargi, 2010). O modelo do biorreator apresenta design simples e de fácil operação, possibilita minimizar gradientes de concentração, porém não de forma totalmente eficiente (Rodrigues et al., 2011).

3. Biorreator de leito fixo e leito fluidizado

Nos biorreatores de leito fixo (Figura 6-C1) as células encontram-se aderidas a um leito de microcarregadores ou outras formas de suporte (*scaffolds*). O meio de cultivo previamente aerado passa por entre o leito fornecendo às células os componentes de interesse. Nesse modelo, deve-se ter atenção ao tamanho de leito, para que a concentração de oxigênio dissolvido não atinja níveis críticos na região da saída (MORAES et al., 2008). Segundo Eibl et al. (2009), as características do biorreator de leito fixo apresentam potencial de aplicação para a área de engenharia de tecidos. Nos biorreatores de leito fluidizado (Figura 6-C2), as células são aderidas em microcarregadores em suspensão pela circulação do meio de cultivo aerado em região fora da zona de fluidização (MORAES et al., 2008).

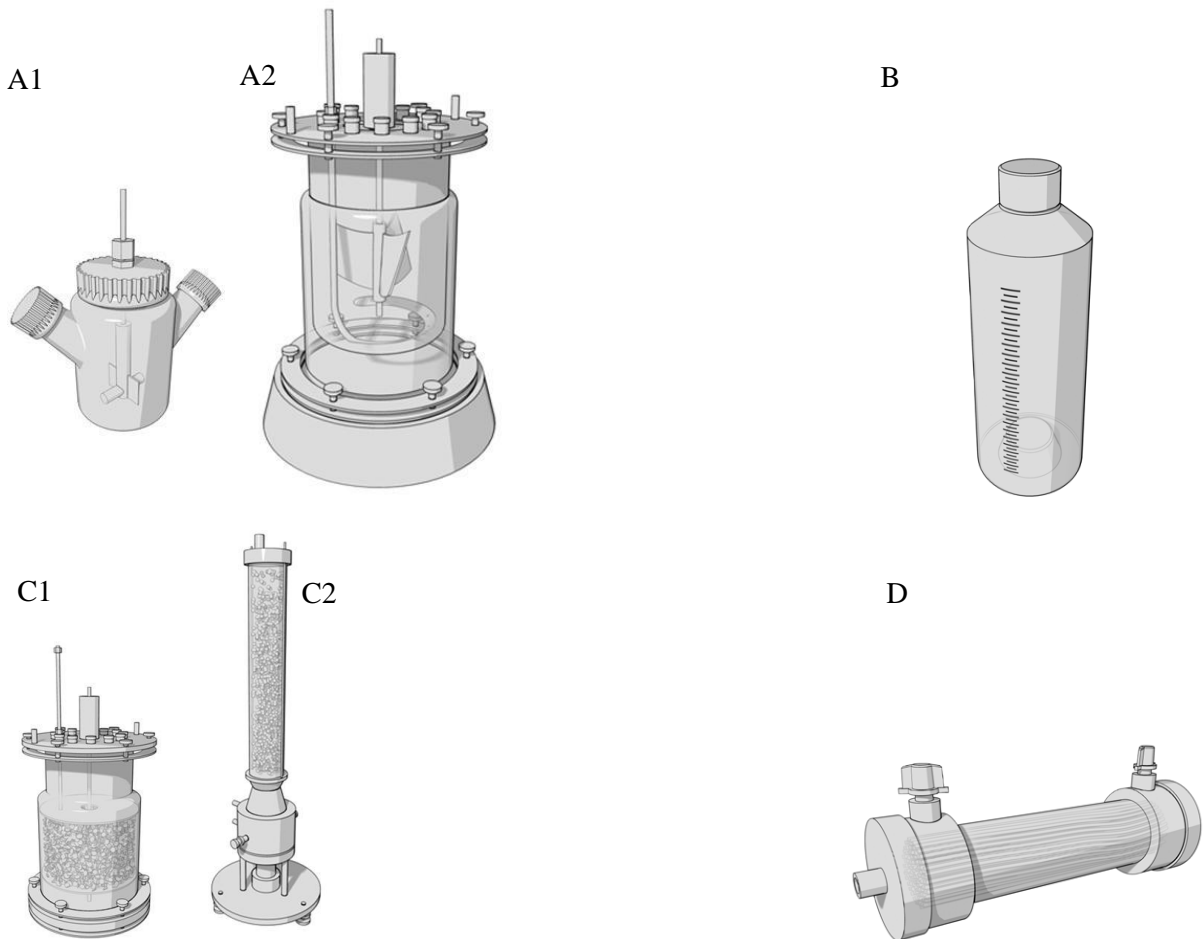
4. Biorreator de fibras ocas

A aplicação da técnica de crescimento de células no exterior de microfibras de plástico foi desenvolvida por Knazek et al. (1972). O biorreator de fibras ocas é constituído por um cartucho de membranas semipermeáveis (fibras ocas) (Figura 6-D). As fibras apresentam porosidade tal que permite, devido aos gradientes de concentração, o

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

fornecimento de nutrientes e oxigenação às células, assim como a retirada de metabólitos tóxicos, possibilitando o crescimento das células entre as fibras (MORAES et al., 2008). O monitoramento e controle não são simples (Rodrigues et al., 2011). O design desse modelo de biorreator deve garantir que não ocorra limitação por transferência de massa dos nutrientes e metabólitos quando o processo atinge alta densidade celular, o que resulta na queda da viabilidade do cultivo (Eibl et al., 2009).

Figura 6 – Modelos de biorreatores aplicados no cultivo de células animais. A1 - spinner, A2 - tanque agitado, B - parede rotativa, C1 - leito fixo, C2 - leito fluidizado, D - fibras ocas. Dimensões sem correspondência com a dimensão original.



Fonte: Bleckwenn e Shiloach, 2004.

5. Biorreator de ondas – Sistema de Uso Único

Os primeiros sistemas de cultivo aplicando o movimento de ondas foram desenvolvidos em 1990 (Eibl et al., 2010). O primeiro biorreator baseado no movimento de ondas desenvolvido pela General Electric foi apresentado no ano de 1996 (Singh, 2005) e a aplicação comercial, a qual está relacionada ao desenvolvimento técnico e automatização, iniciou por volta do ano 2000 (Eibl e Eibl, 2009).

O biorreator com movimento induzido de ondas ou biorreator Wave (Wave BioreactorTM - GE Healthcare Life Sciences) trata-se de um Sistema de Uso Único (SUS), formado por duas partes principais, a plataforma de operação e a CellbagTM (Figura 7). As particularidades do biorreator Wave estão relacionadas ao movimento de ondas gerado pela plataforma onde é fixada a Cellbag e por esta ser descartável.

A Cellbag trata-se do compartimento empregado para o cultivo. Fabricada com material biocompatível e inerte (Polietileno de baixa densidade/Etileno Vinil Acetato), aprovado pela FDA, e previamente esterilizada por radiação gama (Singh, 1999). Por ser de uso único e pré-validada elimina a necessidade de validação do processo de esterilização do biorreator, reduzindo custos e tempo para iniciar o processo de produção, além do reduzido potencial de contaminação. 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 possui sensores para monitoramento do pH, temperatura e oxigênio dissolvido na Cellbag.

O sistema de operação é automatizado. A intensidade do movimento de ondas aplicado pela plataforma é facilmente controlada através da escolha da velocidade de agitação e do ângulo de inclinação da plataforma. Do mesmo modo, é a plataforma a responsável pela manutenção da Cellbag na temperatura desejada. Também tem-se controle da composição da atmosfera do cultivo através da regulação da velocidade de injeção de CO₂, N₂, ar e O₂ e da escolha do setpoint desejado para o percentual requerido desses gases na Cellbag.

Figura 7 – Biorreator Wave™ – Sistema 2/10. Plataforma de operação com módulo de perfusão e Cellbag™ (A); módulo de controle Wavepod™ II Integrated Controller (B).



Fonte: GE Healthcare Life Sciences - ReadToProcess™.

A esterilidade do ar que entra na Cellbag é garantida através de um filtro com $0,2 \mu\text{m}$ (Singh, 1999). Trata-se de um sistema fechado, que não precisa ser manipulado em câmara de fluxo laminar para retirada de amostras. A Cellbag possui porta de conexão auto-selada que mantém o conteúdo isolado do meio externo (Akerström, 2009). Contudo, o sistema de amostragem não é de fácil manipulação, quando comparado a outros modelos de biorreator (Akerström, 2009; Rodrigues et al., 2011).

É possível operar o sistema em diferentes regimes de alimentação. A plataforma do biorreator Wave pode ser acoplada a um módulo de perfusão, para controle da injeção e saída de fluido (Eibl e Eibl, 2009). Para essa operação deve-se utilizar uma Cellbag especial, a qual 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 a Cellbag mostrou-se eficiente para volumes de trabalho de até 100 L (Eibl e Eibl, 2009).

Através do movimento de ondas imposto ao fluido, o qual possibilita aumentar a área da interface líquido-ar, que 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 $1,6 \text{ h}^{-1}$ e para Cellbag de 20 L operando com 10 L, os valores de $k_{L}a$ são da ordem de $4,0 \text{ h}^{-1}$ (Singh, 1999).

O movimento de ondas induzido pela plataforma não provoca danos às células já que não há formação de bolhas ou choques com impelidor, por exemplo, e facilita a alternância entre as camadas de fluido, o que eleva o potencial de mistura (MORAES et al., 2008). O tempo de mistura para que o fluido atinja homogeneidade varia entre 5 e 10 s em Cellbag de 20 L operando com 10 L e 60 s em Cellbag de 200 L operando com 100 L (Singh, 1999).

Regime de agitação e Potência

Para descrever a fluidodinâmica do biorreator Wave utiliza-se o número de Reynolds modificado (Re_{mod}), o qual leva em consideração as características da Cellbag (dimensões e altura de líquido) e um fator de correção para descrever a influência do volume de operação e agitação da plataforma (Equação 1) (Eibl e Eibl, 2009). Os autores apresentam, de acordo com a Equação 1 e análise visual, para Cellbag de 2L, regime laminar para Re_{mod} menor que 200 e regime de transição para Re_{mod} entre 200 e 600.

$$Re_{mod} = \frac{V \times k \times 4 \times C}{v \times (2 \times h + B)} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: V: volume de operação; k: velocidade de agitação da plataforma; C: fator de correção considerando o modelo de Cellbag, ângulo e velocidade de agitação da plataforma e volume de operação; v: viscosidade cinemática; h: altura de líquido na Cellbag; B: largura da Cellbag.

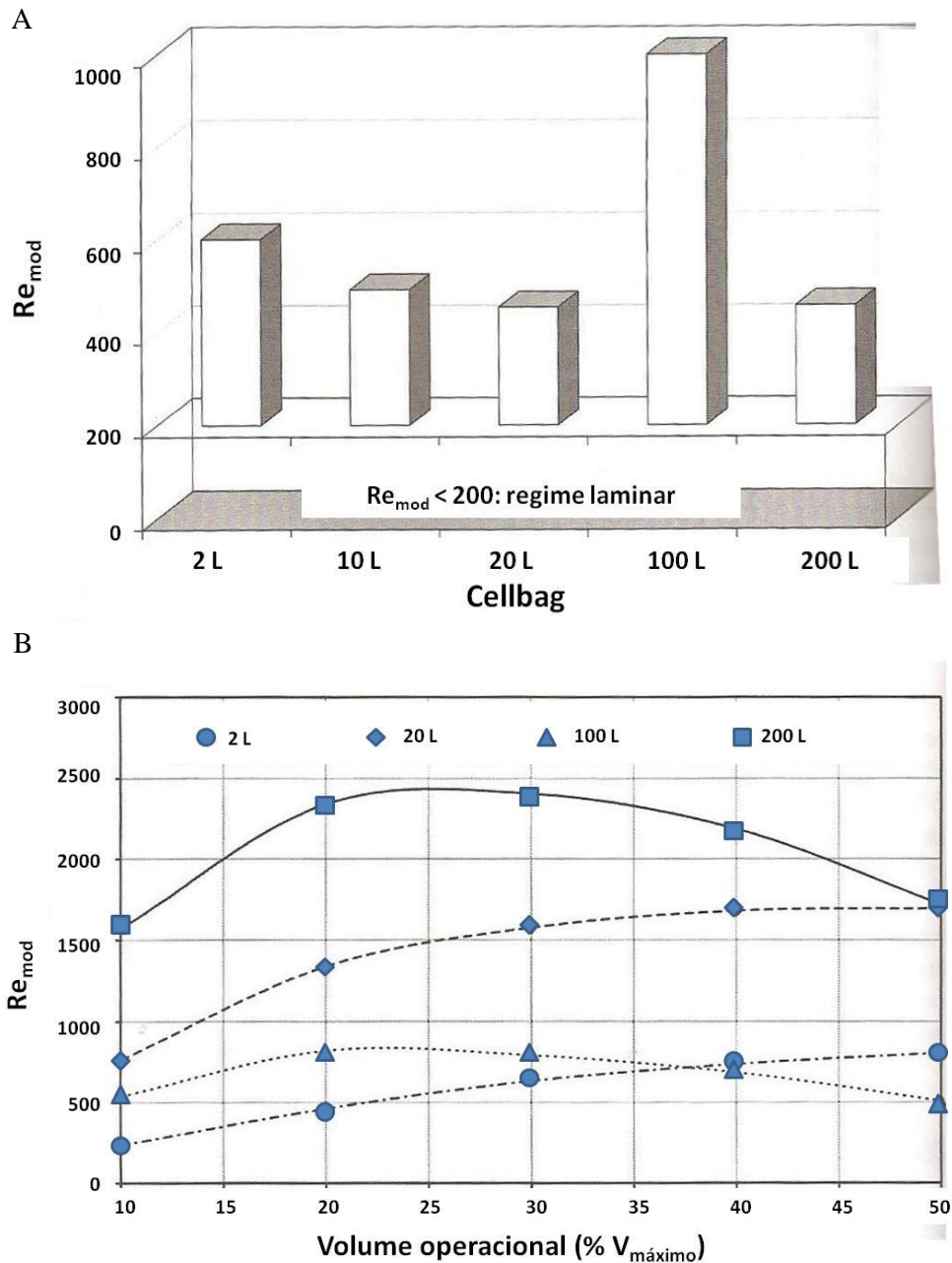
Eibl e Eibl (2009) descrevem para Cellbag de 2L, com agitação de 18 rpm e ângulo de 8°, valores de Reynolds modificado de aproximadamente 250 (10% do volume de operação), 650 (30% do volume de operação) e 800 (50% do volume de operação) (Figura 8).

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 e Eibl, 2009). Os autores descrevem valores de potência específica para Cellbag de 2L entre 100 e 150 W/m³ operando entre os ângulos de 7° de 10°, com 10% do volume de operação e agitação de 9 rpm e menores que 100 W/m³ operando nas mesmas condições e agitação de 6 rpm (Figura 9).

Considerando as condições empregadas nos Experimentos 1 à 4 e os dados apresentados por Eibl e Eibl (2009), com 30% do volume de operação, e agitação máxima de 10 rpm e 5°, o regime mantido na Cellbag é laminar ($Re_{mod} \approx 600$ para 30% do volume de operação com agitação de 18 rpm e ângulo de 8°) e a potência máxima inserida não excede 100 W/m³, nível aceitável para o cultivo de células animais, tendo como valor máximo aconselhável de 111 W/m³ no cultivo de células animais (Eibl e Eibl, 2008). Nos Experimentos 5, 6 e 7, devido à operação com a Cellbag em posição reduzida, a aplicação das relações apresentadas nas Figuras 8 e 9 não é válida devido à alteração na geometria da Cellbag.

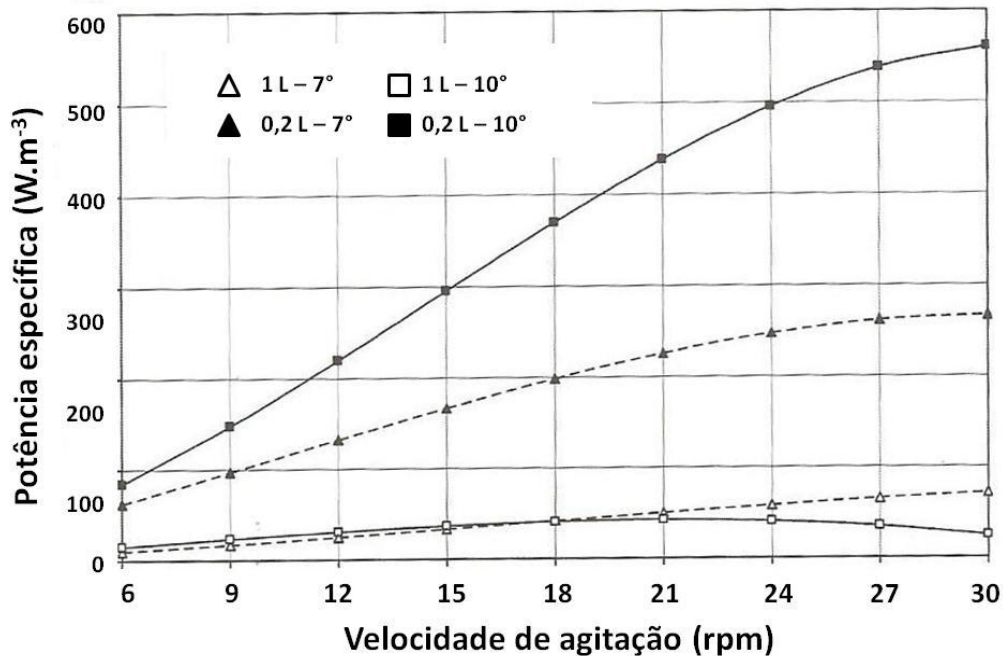
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 8 – A: Zonas de transição do regime laminar para o regime turbulento para Cellbags com diferentes capacidades. B: Valores de Re_{mod} em relação ao volume operacional para Cellbags com diferentes capacidades operando com velocidade de agitação de 18 rpm e ângulo de inclinação de 8° ($V_{máximo}$: volume operacional máximo).



Adaptado de Eibl e Eibl (2009).

Figura 9 – Potência específica inserida de acordo com a velocidade de agitação plataforma para Cellbag de 2 L operando com 0,2 e 1 L com ângulo de inclinação da plataforma de 7 e 10°.



Adaptado de Eibl e Eibl (2009).

2.5. Aplicação do biorreator Wave no cultivo de células dependentes de ancoramento

O biorreator Wave foi apresentado por Singh (1999) como uma alternativa na tecnologia de biorreatores para o cultivo de células de plantas, insetos e animais, viável tanto para células com crescimento em suspensão como para células dependentes de ancoramento.

Existem trabalhos acerca da operação do Wave com células aderentes (Genzel et al. 2006; Hundt et al., 2007), porém, as pesquisas mais detalhadas foram realizadas em centros de pesquisa financiados pela GE Healthcare Department of Cell Technologies. Tais estudos demonstram processos de adesão das células aos microcarregadores realizados dentro ou fora da Cellbag, movimento empregado à plataforma durante as fases de cultivo, relação entre volume de trabalho e velocidade de agitação e ângulo, assim como estudos sobre a eficiência do processo com meios contendo menor teor de soro para diferentes regimes de movimento da plataforma (Pauler e Annerén, 2008; GE Healthcare, 2010). Assim, é preciso ter critérios no levantamento de informações para não haver conclusões equivocadas com base em publicações que possam ter por meta à promoção do próprio equipamento (Eibl et al., 2009).

Destacam-se resultados como o cultivo conduzido com menor intervenção e uso de material, relatando a relação de 1 Cellbag para 80 frascos T e emprego de menos de 40% do volume de meio necessário no cultivo tradicional (Pauler e Annerén, 2008). Com relação aos estudos com meio com menor teor de soro e agitação da plataforma, em meio isento de soro a agitação intermitente (2 min com 16 rpm e 5° e após mantido em repouso por 18 min) propiciou melhor adesão célula-microcarregador comparada à agitação contínua (mantido com 12 rpm e 5,5°). Em se tratando da agitação da plataforma, velocidade superior a 8 rpm propicia o processo de desadesão célula-microcarregador. Acerca do volume de trabalho recomendado para a Cellbag, com menos de 20% do volume recomendado constata-se que os microcarregadores aderem à Cellbag e com mais de 80% o ambiente de cultivo torna-se não homogêneo (GE Healthcare, 2010).

Com relação ao cultivo de CEMs no sistema 2/10, Akerström (2009) estudou a proliferação de wt-hMSC e hMSC-GFP com processo de adição de microcarregadores e Timmins et al. (2012) não obtiveram crescimento no cultivo de células hpMSC no sistema 2/10 para atmosfera com 5% CO₂ e ar e tal desempenho independe se a fase de adesão é realizada dentro ou fora da Cellbag, contudo, verificaram que o cultivo torna-se efetivo em atmosfera mantida com 5% O₂ e 5% CO₂.

2.6. Considerações a respeito da revisão bibliográfica

Realizando uma análise da literatura a respeito do cultivo de células animais em biorreatores e da demanda por processos de cultivo de CEMs com maior produtividade, segurança e reprodutibilidade, o biorreator Wave surge como uma nova opção de processo ainda desconhecida e pouco explorada. O objetivo central deste trabalho, em avaliar o funcionamento do biorreator Wave, apresenta como alvo específico a utilização de novas tecnologias para produção de CEMs e está em plena sintonia com a necessidade de desenvolvimento de bioprocessos com biorreatores inovadores e de uso único, como o Wave. Tais tecnologias de uso único são o alvo da indústria mundial de biofármacos, já que são equipamentos com potencial para produção de grande variedade de produtos para terapia celular e medicina regenerativa. Como integrante de uma nova geração de biorreatores, o biorreator Wave mostra potencial para ser utilizado em processos de cultivo de CEMs mais eficientes e econômicos, porém, essa hipótese precisa ser verificada através de estudos práticos que demonstrem sua validade.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar o potencial do biorreator Wave para ser utilizado na expansão em larga escala laboratorial de CEMs com alta produtividade e com preservação de seu potencial de diferenciação em linhagens específicas visando a obtenção de um produto para ser utilizado em aplicações terapêuticas.

3.2. Objetivos específicos

a. Identificar as dificuldades técnicas mais relevantes do cultivo de CEMs no biorreator Wave que poderão surgir em função das peculiaridades biológicas dessas células, tais como dependência de ancoramento, tendência a formação de agregados e sensibilidade às forças hidrodinâmicas.

b. Resolver as dificuldades acima mencionadas tendo como alvo prioritário um processo de cultivo de alta produtividade, em conformidade com as boas práticas de manufatura e que seja capaz de produzir CEMs viáveis e com qualidade terapêutica.

4. Material e Métodos

1. Preservação das CEMs

Nos estudos realizados empregou-se linhagem de CEMs proveniente da medula óssea (hMSC-TERT) cedida pelo Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto).

As CEMs são células ancorantes, que necessitam de uma superfície para crescimento e são sensíveis às condições de cultivo. A linhagem utilizada foi imortalizada pela expressão da proteína telomerase e possui a expressão de GFP (Green Fluorescent Protein), possibilitando a visualização de células vivas em microscópio para melhor acompanhamento do cultivo. As CEMs foram preservadas em criotubos com meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino (HyClone®, Thermo Scientific, EUA) e 10% de DMSO em nitrogênio líquido (-197 °C). Cada criotubo continha 10^6 células em 1 mL de meio de congelamento.

2. Descongelamento e ativação das CEMs

As CEMs foram descongeladas transferindo o conteúdo do criotubo para tubo de centrifuga de plástico contendo 9 mL de meio de cultivo, centrifugado à 1150 rpm por 4 min. O pellet foi ressuspensão em meio de cultivo e, a seguir, transferido para frasco de cultura, armazenado em incubadora com controle de CO₂, a 37 °C. O meio de cultivo empregado foi α -MEM (Minimum Essential Medium - Gibco, EUA) com vermelho de fenol suplementado com glicose (5,55 mM) (Sigma, EUA), glutamina (2,5 mM) (Sigma, EUA) e arginina (2,5 mM) (Sigma, EUA), além de antibiótico (10% v/v) (Penicilina: 10,000 UI/mL e Estreptomicina : 10,000 μ g/mL) (Gibco, EUA), soro fetal bovino (15% v/v) (HyClone®, Thermo Scientific, EUA), hepes (18 mM) (Sigma, EUA) e 15 mM de bicarbonato de sódio (Experimento 1) (Sigma, EUA) e 24 mM de bicarbonato de sódio (Experimentos 2 - 7). O pH foi ajustado entre 7,2 - 7,4. O meio de cultivo com adição de suplementos foi filtrado através de membrana com poro de 0,22 μ m em câmara de fluxo laminar para garantir esterilidade.

3. Preparo dos microcarregadores

Nos estudos empregou-se o microcarregador poroso CultiSpher-S® (PerCell Biolytica, SE). O microcarregador CultiSpher-S® é feito a base de gelatina, o

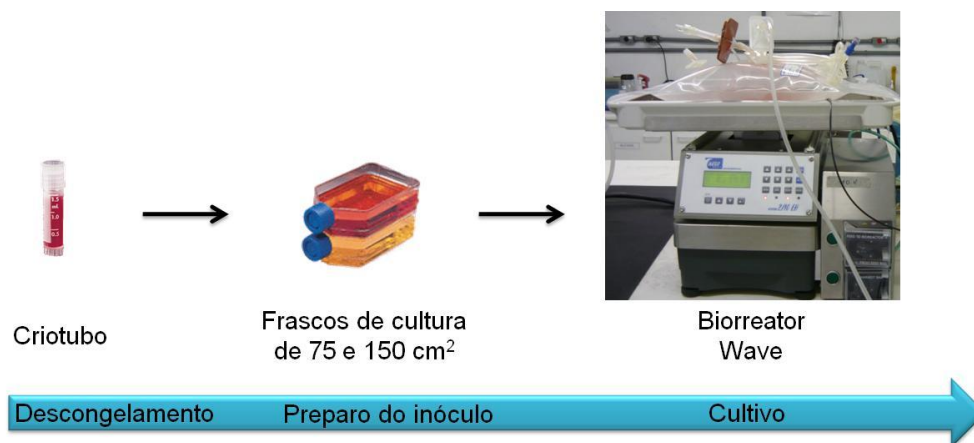
4. MATERIAL E MÉTODOS

diâmetro da 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 MC foi hidratada em PBS (NaCl, 8 g/L; KCl, 0,2 g/L; Na_2HPO_4 , 1,15 g/L e K_2HPO_4 , 0,2 g/L, pH ajustado na faixa de 7,2 - 7,4, solução esterilizada através de filtração em membrana com poro de 0,22 μm (Millipore)) e esterilizada de acordo com as especificações técnicas (Percell Biolytica). A concentração de MC utilizada foi escolhida seguindo a relação de 50 células por microcarregador na inoculação, de acordo com metodologia já empregada no LATECC (Mendonça, 2013; Luna, 2014).

4. Preparo do inóculo

O preparo do inóculo do biorreator consiste no descongelamento do criotubo contendo as células de trabalho (hMSC-TERT) e posterior cultivo das mesmas em frascos de cultura a fim de atingir o número de células necessárias para dar início ao experimento no biorreator Wave. A Figura 10 apresenta a sequência das etapas para inoculação do biorreator.

Figura 10 – Esquema das etapas envolvidas no preparo do inóculo utilizado nos experimentos de cultivo no biorreator Wave.

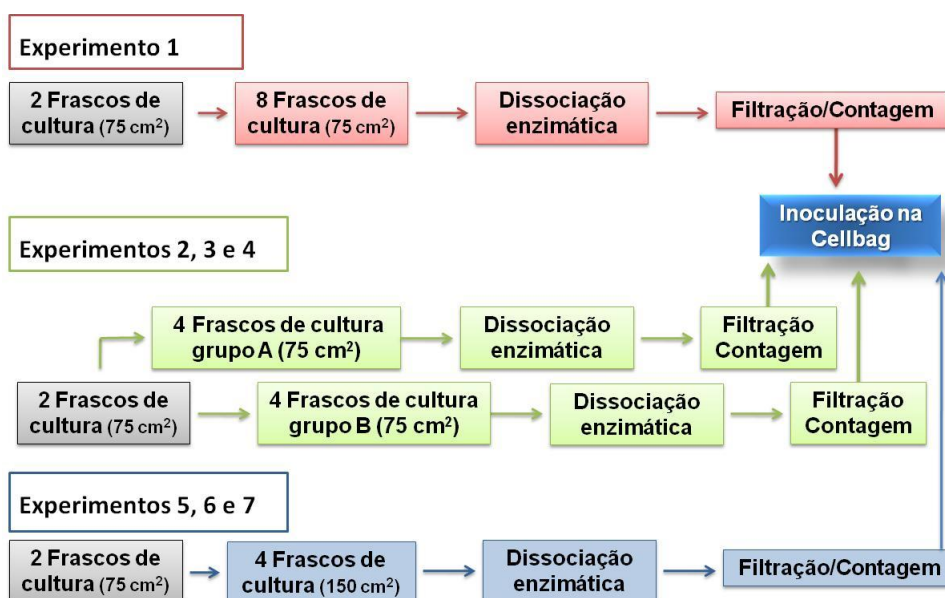


Nos experimentos 1 à 4 as células foram expandidas em frascos de cultura de 75 cm^2 . Nos experimentos 5 à 7 a etapa final de expansão foi realizada em frascos de cultura de 150 cm^2 . O procedimento de inoculação da Cellbag consistiu no tratamento enzimático dos frascos de cultura para a desadesão das células. Em seguida a suspensão de células foi centrifugada, o pellet ressuspenso e, a seguir, filtrava-se a suspensão para evitar aglomerados de células e fazia-se a contagem de células em suspensão (Figura 11). No experimento 1 todos os frascos de cultura (8 frascos de

4. MATERIAL E MÉTODOS

75 cm²) foram manipulados simultaneamente para inocular a Cellbag. Nos experimentos 2, 3 e 4 os frascos de cultura foram divididos em grupos (grupo A e B com 4 frascos de 75 cm² cada) e inoculados separadamente para reduzir o tempo em que as células eram submetidas às condições de estresse mecânico. Os experimentos seguintes (experimentos 5, 6 e 7), por se trabalhar com frascos de cultura de 150 cm², o número de frascos foi reduzido à metade, o que possibilitou o tratamento e inoculação da Cellbag em uma única etapa.

Figura 11 – Esquema resumido dos procedimentos de inoculação para os experimentos realizados no biorreator Wave.



5. Operação do biorreator Wave e tratamento da amostra

Os procedimentos de inoculação, amostragem e adição de meio de cultivo na Cellbag foram realizados em câmara de fluxo laminar (Sterilgard III, classe II, modelo SG403, Baker Company - EUA). O cultivo das CEMs foi realizado em CellbagsTM. Trata-se de bolsas de polietileno descartáveis e pré-esterilizadas. As Cellbags empregadas são de 2 L, com volumes de trabalho recomendado entre 0,2 a 0,8 L (GE Healthcare, 2010). O módulo de controle WavepodTM II possibilita monitoramento de pH e oxigênio dissolvido e controle da composição da corrente de entrada de ar na Cellbag. A plataforma de operação permite o controle da temperatura e agitação, com velocidade entre 2 - 40 rpm e angulação da plataforma entre 2 - 9°. A amostragem foi realizada a cada 24 h, sendo que na fase de adesão, as amostras foram retiradas com até 8 h de operação, dependendo do experimento. A Figura 12 apresenta o

4. MATERIAL E MÉTODOS

procedimento de tratamento da amostra retirada da Cellbag e a Figura 13 o biorreator Wave Sistema 2/10 e a unidade de controle utilizados nos experimentos.

Figura 12 – Procedimento de tratamento das amostras retiradas da Cellbag durante os experimentos de cultivo da linhagem hMSC-TERT.

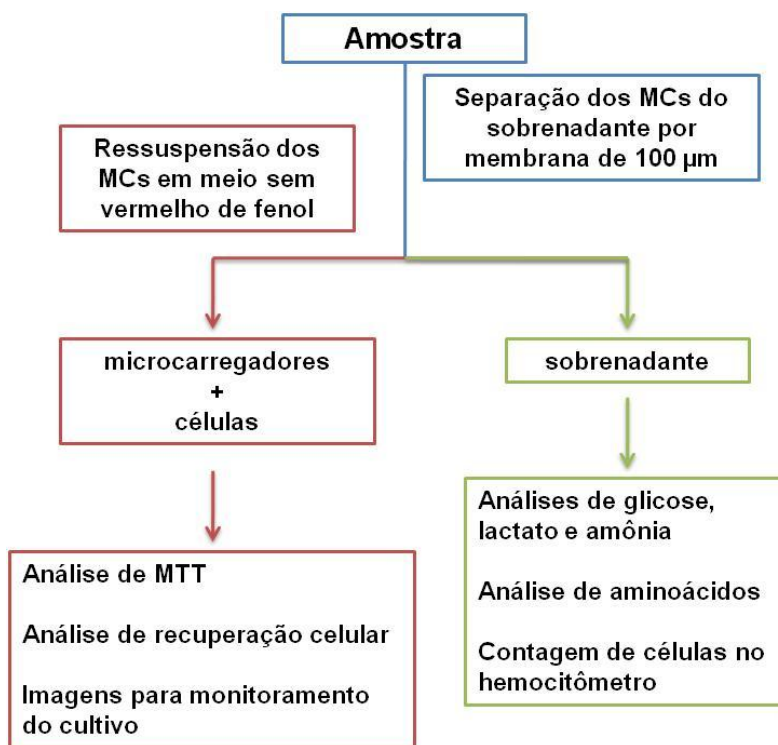
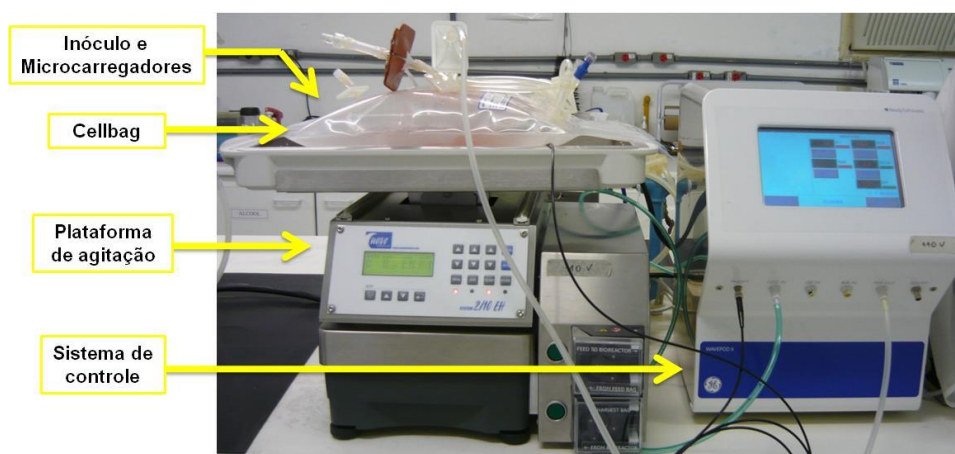


Figura 13 – Biorreator Wave TM utilizado nos experimentos de cultivo da linhagem hMSC-TERT: Plataforma 2/10 e Módulo de Controle Wavepod TM II.



6. Determinação da densidade e viabilidade celular

A determinação da densidade e viabilidade celular durante a fase de preparo do inóculo e nas determinações durante a fase de cultivo do número de células recuperadas e número de células no sobrenadante foi realizada pela contagem de células coradas e não coradas nos quadrantes de contagem do hemacitômetro. O hemacitômetro ou Câmara de Neubauer possui quadrantes de contagem com profundidade definida entre a base e a lamínula inserida. Cada quadrante de contagem contém 10^{-4} mL da solução de amostra e corante. 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 é obtida pela Equação 2.

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\sum N_i}{\sum Q} \times \frac{Q}{10^{-4} \text{ mL}} \times fd \quad [\text{cel.mL}^{-1}] \quad \text{Equação 2}$$

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

7. Análise de recuperação celular

A análise de recuperação das células aderidas aos microcarregadores foi feita pela ação da enzima TrypleTM Express (Gibco, EUA) 10 vezes concentrada (Tryple10x). Em alíquota de 500 μ L da amostra lavada com meio sem fenol era adicionada a enzima Tryple10x. A alíquota era colocada em banho-maria a 37°C por 15 min para completa dissolução dos microcarregadores. Em seguida fazia-se a determinação da densidade de células viáveis não viáveis pela contagem de células coradas e não coradas no hemacitômetro.

8. Quantificação de células viáveis pelo método do MTT

Para aplicar o método MTT fazia-se uma curva de calibração relacionando a densidade celular com a medida espectrofotométrica da absorbância da solução. O reagente MTT ou brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio foi empregado para determinar com espectrofotômetro (Multiskan FC - Thermo Scientific) a concentração celular viável verificada pela mudança da 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. A alíquota de 400 µL da amostra lavada com meio de cultivo sem fenol era destinada a análise de viabilidade celular por MTT. Adiciona-se 40 µL de solução de MTT e deixa-se em incubadora à 37 °C por 4 h. Após adicionava-se 400 µL de solução de solubilização para solubilizar os cristais de formazan e então agitava-se em vórtex e centrifuga-se para separar o pellet. O sobrenadante foi analisado em placa de 96 poços em triplicata em espectrofotômetro. A leitura da amostra tratada era realizada em 570 nm. Assim, com a leitura da absorbância da amostra tinha-se o dado da viabilidade celular dada em função da atividade mitocondrial. A viabilidade celular média das leituras obtidas no espectrofotômetro e o desvio padrão foram calculados através do software Microsoft Excel 2007.

9. Metodologias de cálculo

O crescimento do cultivo pode ser expresso pelo fator de expansão celular (FE), apresentado pela Equação 3.

$$FE = \frac{N_f}{N_i} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: N_f : número final de células no cultivo; N_i : número inicial de células.

A velocidade específica de crescimento celular (μ), apresentada pela Equação 4, fornece a velocidade de aumento do número de células no cultivo para determinado incremento de tempo. As CEMs em cultivo *in vitro* apresentam μ aproximado de 0,020 h⁻¹ (Schop, 2010). A velocidade de crescimento celular é constante e máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) na fase de crescimento exponencial e calculada por regressão linear da fase exponencial do gráfico plotando-se o logaritmo neperiano do número de células no tempo i (N_i) pelo tempo de operação (t_i) (Equação 5).

$$\mu = \frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N} \quad [h^{-1}] \quad \text{Equação 4}$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} = \frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N} \therefore \mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln(N_2/N_1)}{(t_2-t_1)} \quad [h^{-1}] \quad \text{Equação 5}$$

Onde: N : número de células no instante determinado; N_1 : número de células no tempo t_1 ; N_2 : número de células no tempo t_2 .

O tempo que o cultivo leva para dobrar o número de células é denominado tempo de duplicação (t_d), fornecido pela Equação 6. Para células animais, o t_d varia entre 15 e 25 h (Butler, 2004). A fim de avaliar a relação metabólica entre consumo de substrato (glicose e glutamina) e produção do metabólito correspondente (lactato e amônia)

utiliza-se a relação metabólito m produzido por substrato s consumido ($Y_{M/S}$), apresentado pela Equação 7.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [\text{h}] \quad \text{Equação 6}$$

$$Y_{M/S} = -\frac{dM}{dS} \quad [\text{molM.molS}^{-1}] \quad \text{Equação 7}$$

10. Análise de glicose, glutamina e lactato

As análises de glicose, glutamina e lactato foram realizadas a partir de alíquota obtida do sobrenadante da amostra no analisador bioquímico YSI (YSI 7100MBS).

11. Análise de aminoácidos

As análises de aminoácidos foram executadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia proposta por Henrikson e Meredith (1984). Alíquota de 200 μL do sobrenadante das amostras retiradas da Cellbag foram destinadas para as análises de CLAE (Waters e2695 Separations Module, Waters 2998 Photodiode Array Detector, Waters 2424 ELS Detector, Waters 2414 Refractive Index Detector). A preparação das amostras englobou os procedimentos de filtração, secagem, re-hidratação, derivatização e diluição em tampão para injeção no cromatógrafo. Empregou-se na pré-coluna de derivatização o reagente de derivatização fenil-isotiocianato (PITC - Reagente de Edman) o qual degradava sequencialmente aminoácidos em amins primárias e secundárias a temperatura ambiente em 254 nm. O método utilizou fase estacionária constituída pela coluna pico-tag (Waters) e as fases móveis A (acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água Milli-Q e acetonitrila) e B (água e acetonitrila). Foram preparadas curvas padrão de arginina (Sigma, EUA), asparagina (Sigma, EUA) e glutamina (Sigma, EUA).

12. Análise de amônia

A análise de amônia foi realizada com medidor de eletrodo de íon seletivo (ORION 710A - Thermo Scientific, EUA). Para aplicar esse método faz-se uma curva de calibração com uma solução padrão de amônia.

13. Redução da área de superfície molhada da Cellbag

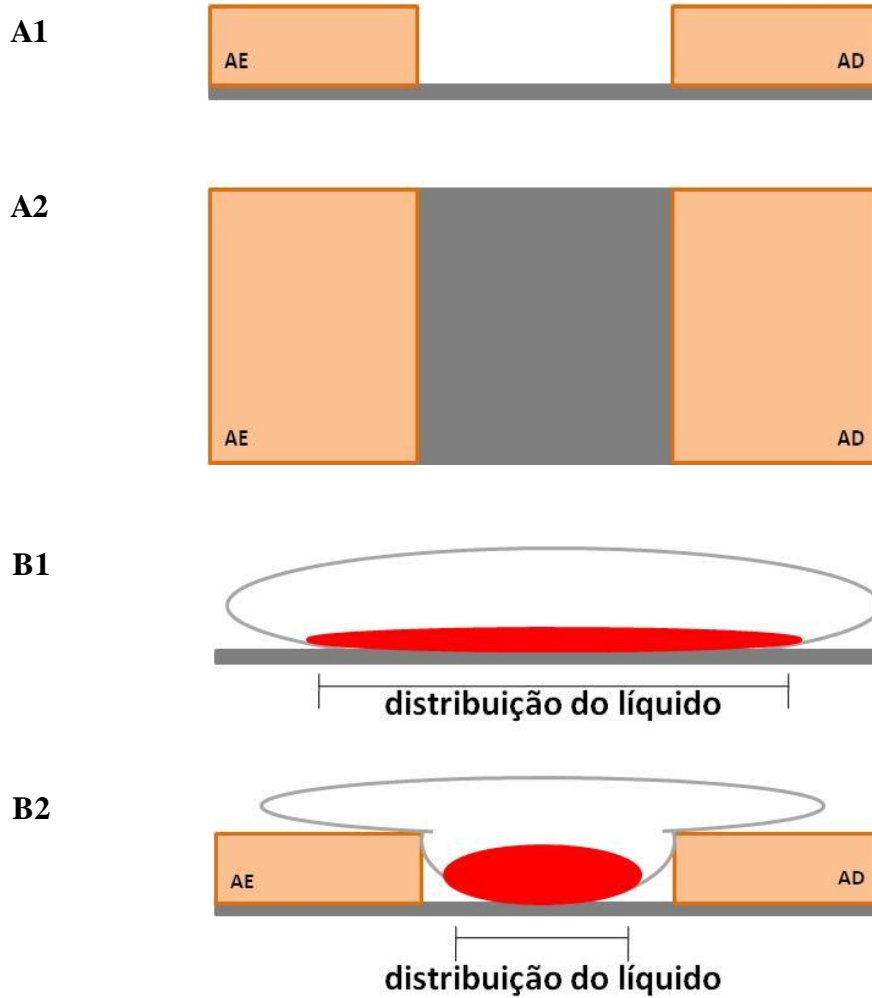
A redução da área de superfície molhada da Cellbag foi realizada pela colocação de apoios retangulares nas laterais da plataforma de operação para restringir o volume de líquido em um espaço menor quando comparado ao espalhamento do líquido com a Cellbag na posição normal de operação. A Figura 14 apresenta o esquema da plataforma de operação com os apoios laterais (Figura 14 - A1 e A2) e a distribuição do líquido na Cellbag quando em posição normal de operação (Figura 14 - B1) e quando a Cellbag está colocada na plataforma entre os apoios laterais (Figura 14 - B2). A Figura 15 apresenta a Cellbag em posição normal de operação e com a redução da área de superfície molhada. Os dados da área de superfície molhada da Cellbag ($A_{SMCellbag}$) e a relação entre a área de adesão (A_{MC}) e a $A_{SMCellbag}$ para os experimentos realizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados da relação entre área de adesão e área de superfície molhada da Cellbag para os experimentos realizados.

Experimento	$A_{SMCellbag}$ (cm^2)	$A_{MC}/A_{SMCellbag}$
E1	400	0,77
E2	400	0,77
E3	75	3,07
E4	240	1,27
E5	240	1,27
E6	240	1,27
E7	240	1,27

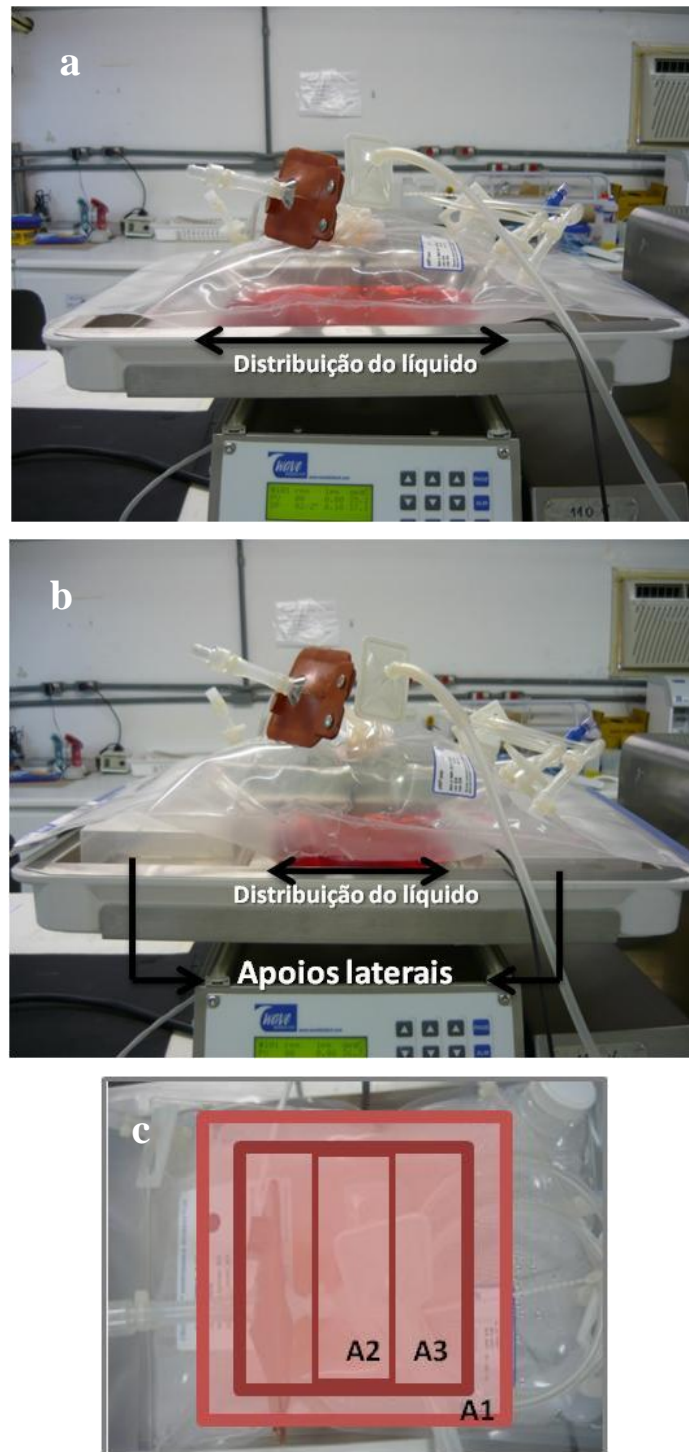
4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 14 – A1: Vista lateral da plataforma de operação com apoios colocados nas laterais; A2: Vista superior da plataforma de operação com apoios laterais; B1: Vista lateral da plataforma com a Cellbag em posição normal de operação; B2: Vista lateral da plataforma com a Cellbag restringida pelos apoios laterais. Nomenclatura: AE - apoio lateral esquerdo; AD - apoio lateral direito.



4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 15 – (a) Cellbag em posição normal de operação; (b) Cellbag com apoios laterais para aumentar a relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$; (c) Esquema representativo das áreas de superfície molhada da Cellbag. Onde: A1: área normal de operação para volume de trabalho de 300 mL (Experimentos 1 e 2); A2 (Experimento 3) e A3 (Experimentos 4, 5, 6 e 7): áreas de operação com o líquido restringido por apoios laterais colocados na plataforma.



14. Adição de microesferas de alginato de cálcio

As microesferas de alginato de cálcio foram preparadas a partir de uma solução de alginato de sódio (2% m/v) (Sigma- Aldrich) a qual foi colocada em recipiente com spray e então borrifada com distância de 10 cm do recipiente contendo solução de cloreto de cálcio (2% m/v) (Sigma- Aldrich). Após, as microesferas formadas foram separadas por peneiras com diâmetro de malha de 250 e 125 μm (Figura 16). As MA selecionadas foram esterilizadas em autoclave e armazenadas sob refrigeração para emprego no cultivo (Figura 17).

Figura 16 – Esquema do procedimento empregado para a produção das microesferas de alginato de cálcio. A solução de alginato foi colocada em um recipiente com spray e então borrifada com distância de 10 cm do recipiente com solução de cloreto de cálcio. Após, as microesferas formadas foram separadas por peneiras com diâmetro de malha de 250 e 125 μm .

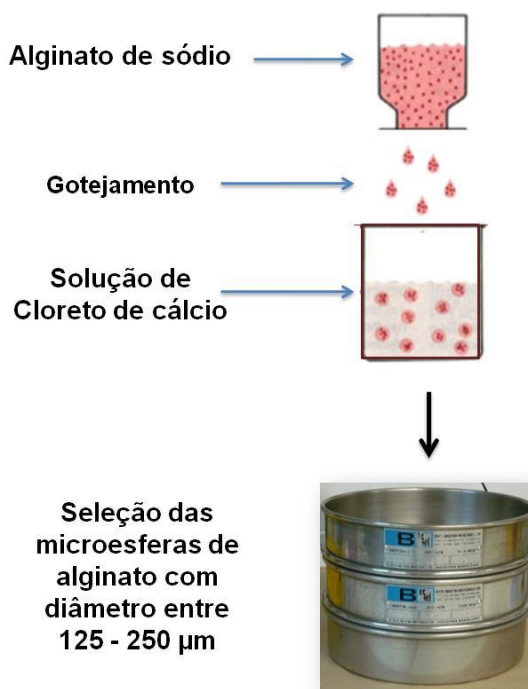


Figura 17 – Microesferas de alginato de cálcio com diâmetro entre 125 - 250 μm .
Magnificação de 100x.



Fonte: acervo pessoal.

15. Sistema de vibração

A plataforma do biorreator Wave apresenta movimento unidirecional, o que para velocidades de agitação não intensas e baixos volumes de trabalho acaba permitindo a adesão dos microcarregadores nos extremos da Cellbag, assim como regiões no líquido com grande número de microcarregadores. Com intuito de solucionar esse problema foi desenvolvido um sistema de vibração (Figura 18) para ser acoplado à parte superior da Cellbag, o qual gera vibrações a fim de auxiliar na movimentação dos microcarregadores. O sistema desenvolvido permite o controle do tempo de vibração aplicado. A disposição dos motores de vibração na parte superior da Cellbag está apresentada na Figura 19.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 18 - Sistema de vibração desenvolvido para ser acoplado à parte superior da Cellbag a fim de gerar vibrações que auxiliem na movimentação dos microcarregadores. Desenho e desenvolvimento: Ricky Nelson Burgos Gavelán. Estudante de doutorado em física. DF/UFSCar.

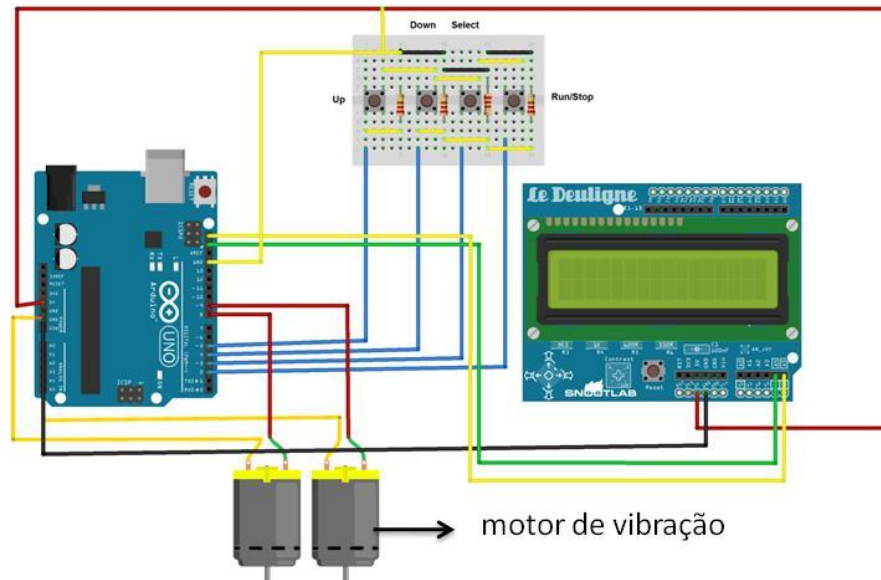
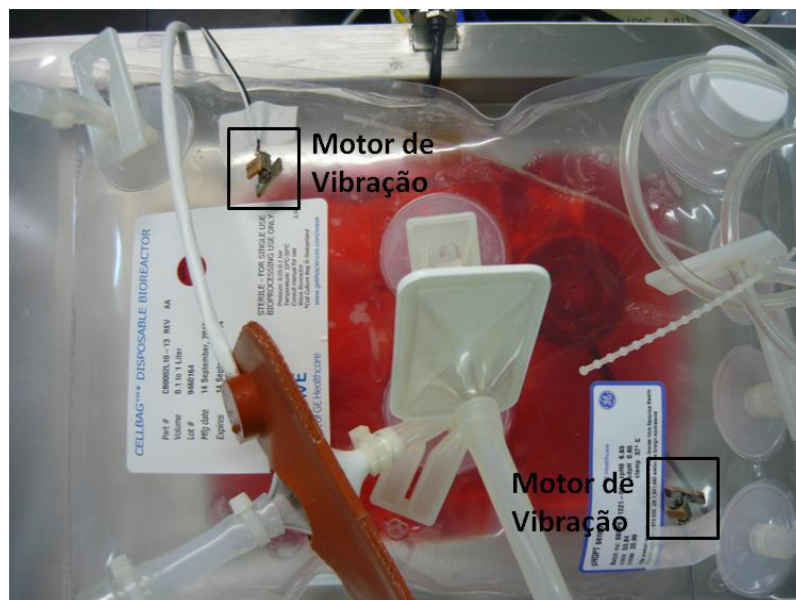


Figura 19 - Cellbag com sistema de vibração acoplado. Em detalhe os motores de vibração colocados na parte superior da Cellbag.



16. Relação de experimentos realizados

Os experimentos realizados foram divididos em três fases, as quais são:

Fase 1 - Análise das características de inoculação e operação: Experimentos 1 e 2.

Fase 2 - Análise da fase de adesão: Experimentos 3 e 4.

Fase 3 - Estratégias para elevar o fator de expansão celular: Experimentos 5, 6 e 7.

As características de operação de cada experimento e a ordem cronológica de execução estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Relação dos experimentos realizados neste trabalho e condições de operação.

Parâmetro	Experimento						
	Fase 1		Fase 2		Fase 3		
	1	2	3	4	5	6	7
X_0 (cel/mL)	1,0E+05	1,0E+05	7,50E+04	9,45E+04	8,23E+04	8,39E+04	1,00E+05
Concentração de microcarregador (g/L)	2,5	2,5	1,8	2,5	2,5	3,0	2,5
N_{cel}/N_{MC} (N_{cel}/N_{MC} com relação às células aderidas)	50 (13)	50 (31)	50 (38)	47	41	35	50
$A_{MC}/A_{SMCellbag}$	0,77	0,77	3,07	1,27	1,27	1,27	1,27
Vinicial (mL)	300	300	300	300	300	250	300
Faixas de velocidade inicial - final (rpm/ângulo)	2/2° - 10/4°	2/2° - 6/5°	4/2° - 10/4°	5/2° - 9/5°	2/2° - 15/6°	2/2° - 14/8°	2/2° - 14/8°
Duração (h)	192	144	120	144	168	120	168
Característica de operação	Operação com Cellbag em posição normal		Operação com $A_{SMCellbag}$ reduzida durante fase de adesão		Operação com $A_{SMCellbag}$ reduzida durante todo o cultivo	Operação com $A_{SMCellbag}$ reduzida durante todo o cultivo	
						Adição de microesferas de alginato de cálcio	Adição de Anti-Clumping

5. Resultados

A falta de informações na literatura especializada sobre o funcionamento e desempenho do biorreator Wave nos levou a uma programação de experimentos cautelosa, cuja evolução pode ser dividida em três fases:

Fase 1 - Análise das características de inoculação e operação: Experimentos 1 e 2.

Fase 2 - Análise da fase de adesão: Experimentos 3 e 4.

Fase 3 - Estratégias para elevar o fator de expansão celular: Cellbag com área de superfície molhada reduzida durante todo o cultivo - Adição de microesferas de alginato - Aplicação do aditivo Anti-Clumping: Experimentos 5, 6 e 7.

5.1. Análise das características de inoculação e operação

A primeira fase da pesquisa abrange os experimentos preliminares e exploratórios, em que se realizaram testes para entender o funcionamento do biorreator Wave com cultivos das CEMs. A seguir se descrevem os dois experimentos que fazem parte da fase 1 da pesquisa.

Experimento 1

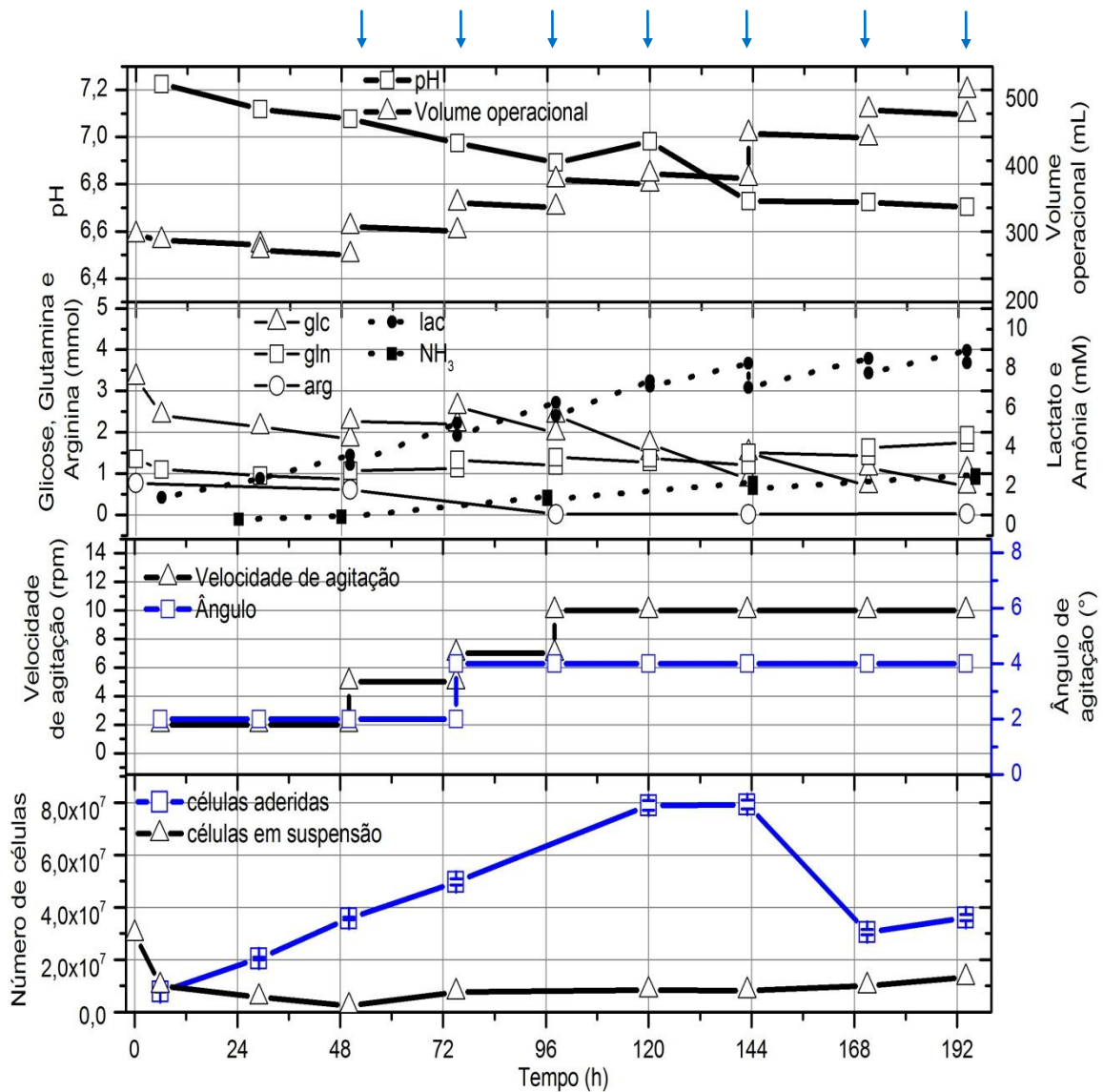
A Cellbag foi inoculada com $1,0 \times 10^5$ cel/mL e 2,5 gMC/L, o que corresponde à relação de 50 células por microcarregador. O volume inicial de trabalho foi 300 mL. Empregou-se meio de cultivo α -MEM suplementado com 15 mM de bicarbonato de sódio. O experimento foi operado com adição de meio de cultivo entre 48 e 192 h na tentativa de controlar a queda de pH para níveis extremos. Os volumes adicionados foram: 50 mL entre 48 e 120 h, 75 mL em 144h, 50 mL em 168 h e 45 mL em 192h. A agitação da plataforma foi mantida em 2 rpm e 2° até 24 h de operação a fim de facilitar a adesão das células aos microcarregadores, passando para 10 rpm e 4° após 96 h de operação.

Conforme analisado na Figura 20, a concentração de arginina era de 2,275 mM com 48 h e passou para 0,067 mM com 96 h, nível limitante para o crescimento do cultivo. As concentrações dos demais aminoácidos não comprometeram o processo e estão apresentadas no Apêndice 3. A concentração de lactato obtida foi de 8,27 mM com 144 h de operação, concentração próxima à inibitória, a qual varia de 10 - 40 mM (Schop, et al., 2010). A

5. RESULTADOS

concentração de amônia atingiu 2,6 mM com 192 h de operação, nível considerado inibitório pelas CEMs, o qual deve ser inferior à 2,4 mM (Schop, et al., 2010).

Figura 20 - Experimento 1 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10%v/v), SFB (15% v/v) e 15 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de meio de cultivo entre 48 e 192 h (indicado por setas azuis). Volumes adicionados: 50 mL em 48 - 120 h, 75 mL em 144h, 50 mL em 168 h e 45 mL em 192h. A agitação da plataforma foi mantida em 2 rpm e 2° até 24h de operação, passando para 10 rpm e 4° após 96 h de operação.



5. RESULTADOS

Após 6 h de cultivo a adesão celular obtida foi de 25,7%, período em que experimentos realizados em spinner no LATECC com a mesma linhagem celular, microcarregador e meio de cultivo mostram que 100% das células inoculadas devem estar aderidas aos microcarregadores, A ineficiência da etapa de adesão prejudicou a fase de crescimento, tendo em vista que a densidade celular inoculada foi superada apenas com 48 h de operação. O fator de expansão foi de 2,6, com velocidade específica de crescimento de $0,026 \text{ h}^{-1}$ (FE de 10,26 considerando o número de células aderidas). Com 72 h de operação houve aumento do número de células em suspensão possivelmente relacionado com a diminuição do nível de arginina no meio e ao pH fora da faixa recomendada. A queda no pH juntamente com a queda na concentração de nutrientes, a concentração do metabólito lactato próxima à inibitória e a concentração de amônia já acima do limite tolerado com 192 h de operação levaram à queda da viabilidade do cultivo.

Experimento 2

Para tentar reverter a queda de pH observada no cultivo no biorreator Wave, a Cellbag foi inoculada com meio de cultivo α -MEM, com a mesma suplementação do experimento anterior porém com 24 mM de bicarbonato de sódio. Essa alteração foi realizada já que a formulação do meio de cultivo empregada mostrou não suportar o crescimento das CEMs sem que seja realizada troca do meio de cultivo. A Cellbag foi inoculada com $1,0 \times 10^5$ cel/mL e 2,5 gMC/L, o que corresponde à relação de 50 células por microcarregador e volume inicial de 300 mL. No Experimento 2 as células expandidas em frascos-T foram divididas em 2 grupos de trabalho com o mesmo número de frascos-T. O procedimento de inoculação na Cellbag foi realizado separadamente para cada grupo com intuito de reduzir o tempo em que as células ficavam expostas às condições de estresse provocadas pela manipulação dos frascos-T (Figura 11).

O Experimento 2 foi operado com adição de 25 mL de meio de cultivo com 96 h, ponto em que o cultivo apresentou queda no valor de pH para 7,1 com intuito de conter a acidificação do meio e também repor nutrientes. A agitação da plataforma foi mantida em 2 rpm e 2° até 24h de operação, passando para 5 rpm e 5° após 96 h de operação (Figura 21). A baixa velocidade de agitação e volume de trabalho, quando comparado ao Experimento 1, provocaram a adesão dos microcarregadores à Cellbag com 72 h de operação (Figura 22).

O fator de expansão foi de 1,84 (FE de 3,37 considerando o número de células aderidas), com velocidade de crescimento específica máxima de $0,021 \text{ h}^{-1}$. A concentração de lactato atingiu 9,11 mM com 72 h de operação, valor já considerado inibitório. A

5. RESULTADOS

concentração de arginina era de 2,420 mM com 72 h e atingiu 0,178 mM com 144 h, ponto após o máximo de crescimento. A concentração de amônia com 96 h estava em 2,17 mM e com 144 h atingiu 4,06 mM, nível já muito acima do inibitório.

Figura 21 - Experimento 2 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10%v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de 25 mL de meio de cultivo com 96 h (indicado por seta). A agitação da plataforma foi mantida em 2 rpm e 2° até 24h de operação, passando para 5 rpm e 5° após 96 h de operação. A agitação menor acarretou na adesão dos microcarregadores na Cellbag com 72 h de operação.

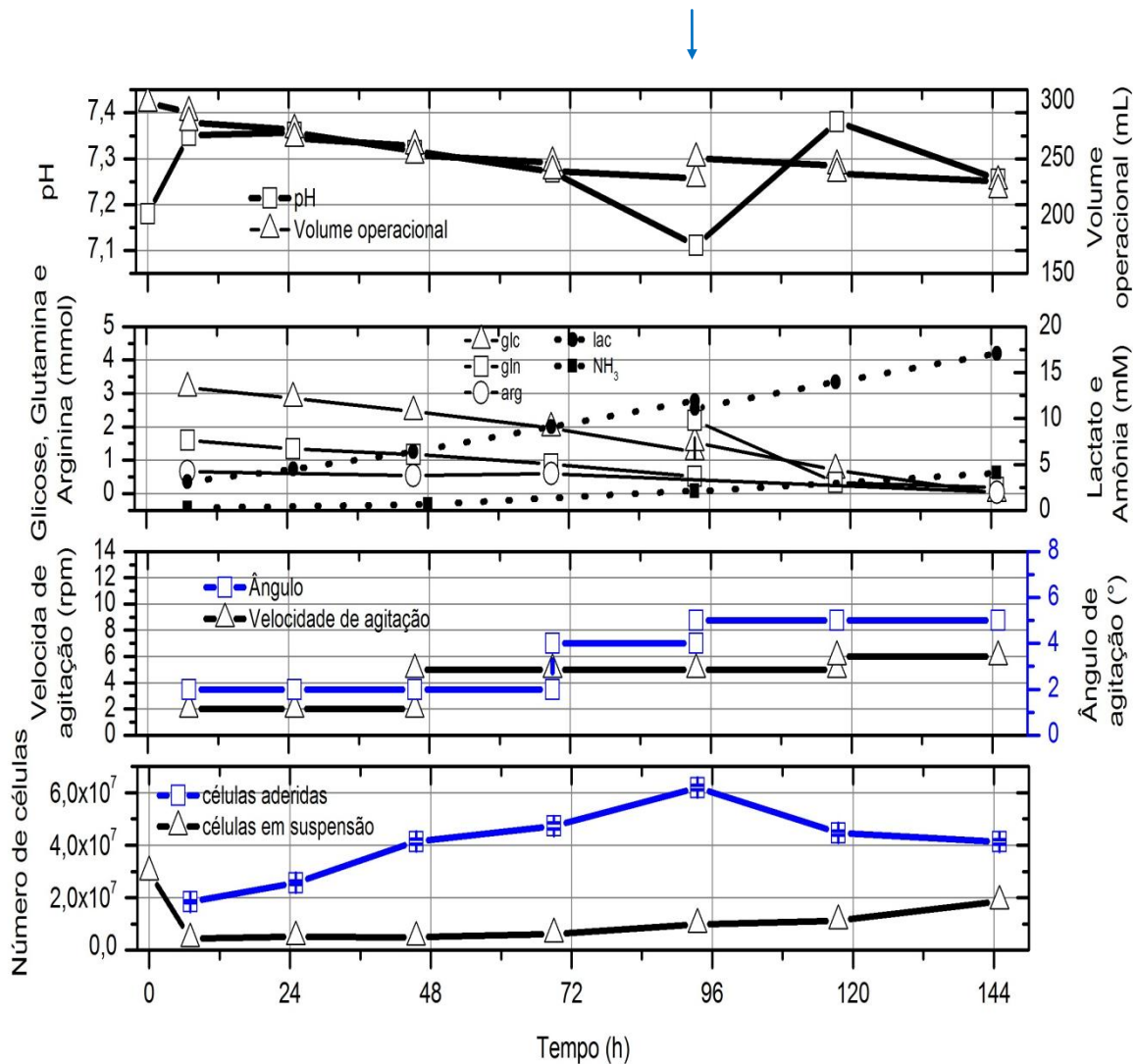
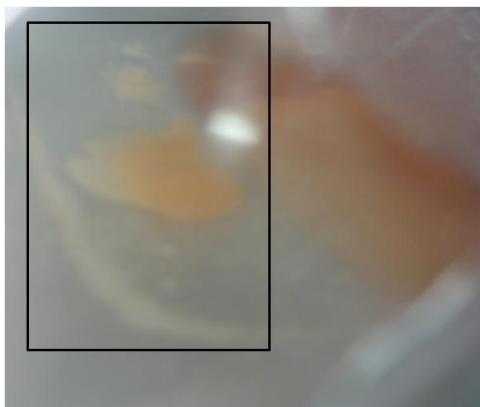


Figura 22 - Deposição de microcarregadores na Cellbag com 72 h de cultivo no Experimento 2.



Fonte: acervo pessoal.

Após 7 h de cultivo a adesão celular obtida foi de 61,7%, sendo que a densidade celular inoculada foi superada com 48 h de operação. O esgotamento de glicose, glutamina e arginina e a elevada concentração de lactato e amônia, juntamente com a condição de estresse provocada pela adesão dos microcarregadores nas posições extremas de Cellbag, fazendo com que os mesmos não ficassem em contato com o meio de cultivo quando a plataforma se movimentava para o extremo oposto, podem ter ocasionado a queda da viabilidade do cultivo após 96 h de operação (Figura 19).

5.2. Análise da fase de adesão

A segunda etapa de experimentos compreende os estudos para analisar e aprimorar a fase de adesão célula-microcarregador. Os experimentos anteriores realizados no biorreator Wave mostraram ineficiência com relação à etapa de adesão, havendo perda de até 74% do total de células inoculadas. Com o volume de trabalho empregado de 300 mL, a relação entre a área de superfície molhada da Cellbag e área total projetada de microcarregadores ($A_{MC}/A_{SMCellbag}$), considerando 2,5 gMC/L, é de 0,77 (empregada nos Experimentos 1 e 2). Essa relação pode permitir que as células não sedimentem sobre os microcarregadores, ficando aderidas à superfície da Cellbag. No spinner com diâmetro de 6 cm, para concentração de 2,5 mgMC/L, a relação entre A_{MC} e área da base ($A_{MC}/A_{SMCellbag}$) é de 1,81. Nesse sentido, os Experimentos 3 e 4 foram realizados com redução da área de superfície molhada durante a fase de adesão, ficando a relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ em 3,07 (Experimento 3) e 1,27 (Experimento 4).

Experimento 3

A Cellbag foi inoculada com densidade celular de $7,5 \times 10^4$ cel/mL, valor menor que a empregada nos estudos anteriores, sendo mantida a relação de 50 células por microcarregador, o que corresponde a 1,88 gMC/L. Empregou-se meio de cultivo α -MEM com mesma suplementação de bicarbonato de sódio do Experimento 2 (24 mM). O volume inicial de trabalho de 300 mL foi restringido por apoios laterais colocados na plataforma, reduzindo a área de superfície molhada da Cellbag (Figura 14 e Figura 15), sendo a relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ nessa situação de 3,07. Essa posição foi mantida durante as primeiras 24 h de operação. A adesão foi de 97,3% com 4 h de operação, porém houve queda com 8 h de operação. A redução da área de superfície molhada da Cellbag reduziu o contato com a plataforma metálica em que a Cellbag é colocada e que transmite calor para manter a temperatura do cultivo em 37 °C, o que explica a queda na adesão com 8 h de operação. As células aderidas no fim da fase de adesão recuperaram o crescimento com 24 h.

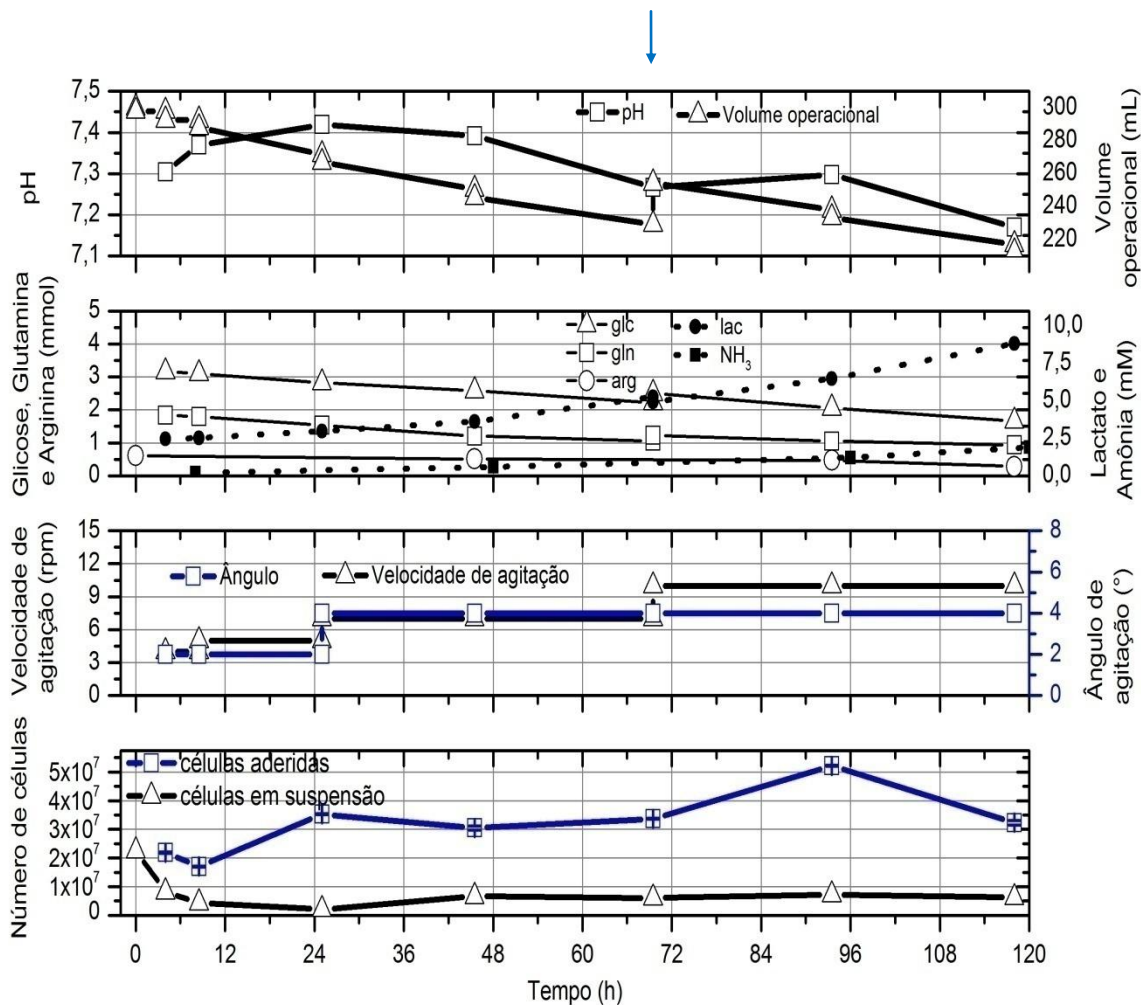
O experimento foi operado com adição de 30 mL de meio de cultivo com 72 h. A agitação da plataforma foi de 4 rpm e 2° nas primeiras 4 h de operação, passando para 7 rpm e 4° após 24 e a 10 rpm e 4° após 72 h (Figura 23).

O fator de expansão foi de 2,32, com velocidade de crescimento específica de $0,01 \text{ h}^{-1}$. Conforme observado na Figura 21, a elevação do pH em 24 h também pode ter influenciado no desempenho da fase exponencial, resultando em baixa velocidade de crescimento. A concentração de arginina atingiu o mínimo de 1,313 mM com 120 h de operação.

Apesar da boa adesão, a densidade celular máxima foi obtida com 96 h. Não houve esgotamento de glicose, glutamina e arginina e a concentração de lactato e amônia não atingiram níveis inibitórios. Contudo, com 48 e 72 h, ocorreu grande retenção de aglomerados de microcarregadores nas regiões extremas da Cellbag, o que gerou um ambiente de cultivo não homogêneo, podendo ter levado ao esgotamento de nutrientes nas regiões onde havia grande concentração de microcarregadores colonizados com células.

5. RESULTADOS

Figura 23 - Experimento 3 – Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de 30 mL de meio de cultivo com 72 h (indicado por seta). A agitação da plataforma foi de 4 rpm e 2° nas primeiras 4 h de operação, passando para 7 rpm e 4° após 24 e a 10 rpm e 4° após 72 h.



Experimento 4

A Cellbag foi inoculada com $9,45 \times 10^4$ cel/mL e 2,5 gMC/L, resultando em 47,3 células por microcarregador. Utilizou-se meio de cultivo α -MEM com a mesma suplementação dos Experimentos 2 e 3. O volume inicial de trabalho de 300 mL foi restringido por apoios laterais colocados na plataforma de maneira a resultar em uma área de superfície molhada maior que a do Experimento 3 para manter maior área da Cellbag em contato com a plataforma (Figura 15), sendo então a relação $A_{MC}/A_{Cellbag}$ de 1,27. Essa

5. RESULTADOS

posição foi mantida durante as primeiras 8 h de operação, tempo em que a totalidade de células inoculadas aderiu aos microcarregadores.

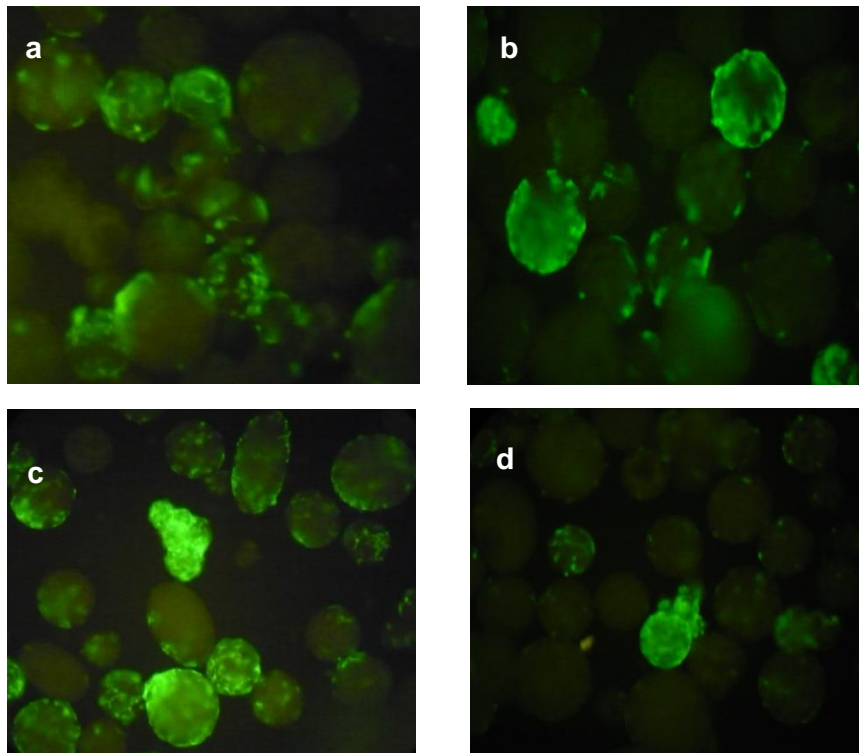
O experimento foi operado com adição de 25 mL de meio de cultivo com 96 e 120 h. A agitação da plataforma foi de 5 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 5° após 24 h e de 9 rpm e 5° após 72 h (Figura 25). No experimento 3 se constatou que grande quantidade de microcarregadores ficou retida em determinadas regiões da Cellbag, principalmente entre a elevação causada pelo sensor de temperatura da plataforma e devido ao movimento em uma única direção da plataforma, o qual não é suficiente para manter uma distribuição homogênea dos MCs. Para tentar solucionar esse problema foi desenvolvido um sistema de vibração conectado à base superior da Cellbag que permite controle do tempo de vibração e do tempo de inércia. Com esse sistema acoplado, constatou-se visualmente uma melhora na distribuição dos microcarregadores na Cellbag assim como a redução da deposição dos MCs nas regiões extremas, contudo, ainda assim houve perda de MCs depositados.

A etapa de adesão foi eficiente, porém a distribuição das células nos microcarregadores no período em que a Cellbag era mantida com redução da área de superfície molhada não foi homogênea, podendo estar relacionada à formação de camadas de microcarregadores na fase de adesão, o que resultou em uma colonização de microcarregadores com muitas células e microcarregadores sem células em maior número quando comparada ao Experimento 3 por análise das imagens de fluorescência dos microcarregadores (Figura 24).

A transferência de células entre microcarregadores é um processo complexo, o que torna essencial a colonização de todos os microcarregadores com o número mínimo de células para que o processo não seja prejudicado (Portner, R. 2007). O fato do Experimento 3 apresentar boa distribuição de células com 24 h, apesar da área de superfície molhada menor que a empregada no Experimento 4, está relacionado à manutenção da Cellbag com área reduzida até 24 h de operação. Nessa situação, o contato entre microcarregadores é facilitado e no período após a adesão as células já apresentam capacidade para migrar entre os microcarregadores (Ohlson, S. et al, 1994).

5. RESULTADOS

Figura 24 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica para o Experimento 3 (a) e Experimento 4 (b) no fim da fase de adesão e Experimento 3 (c) e Experimento 4 (d) com 24 h de operação. Magnificação de 100x.



Fonte: acervo pessoal.

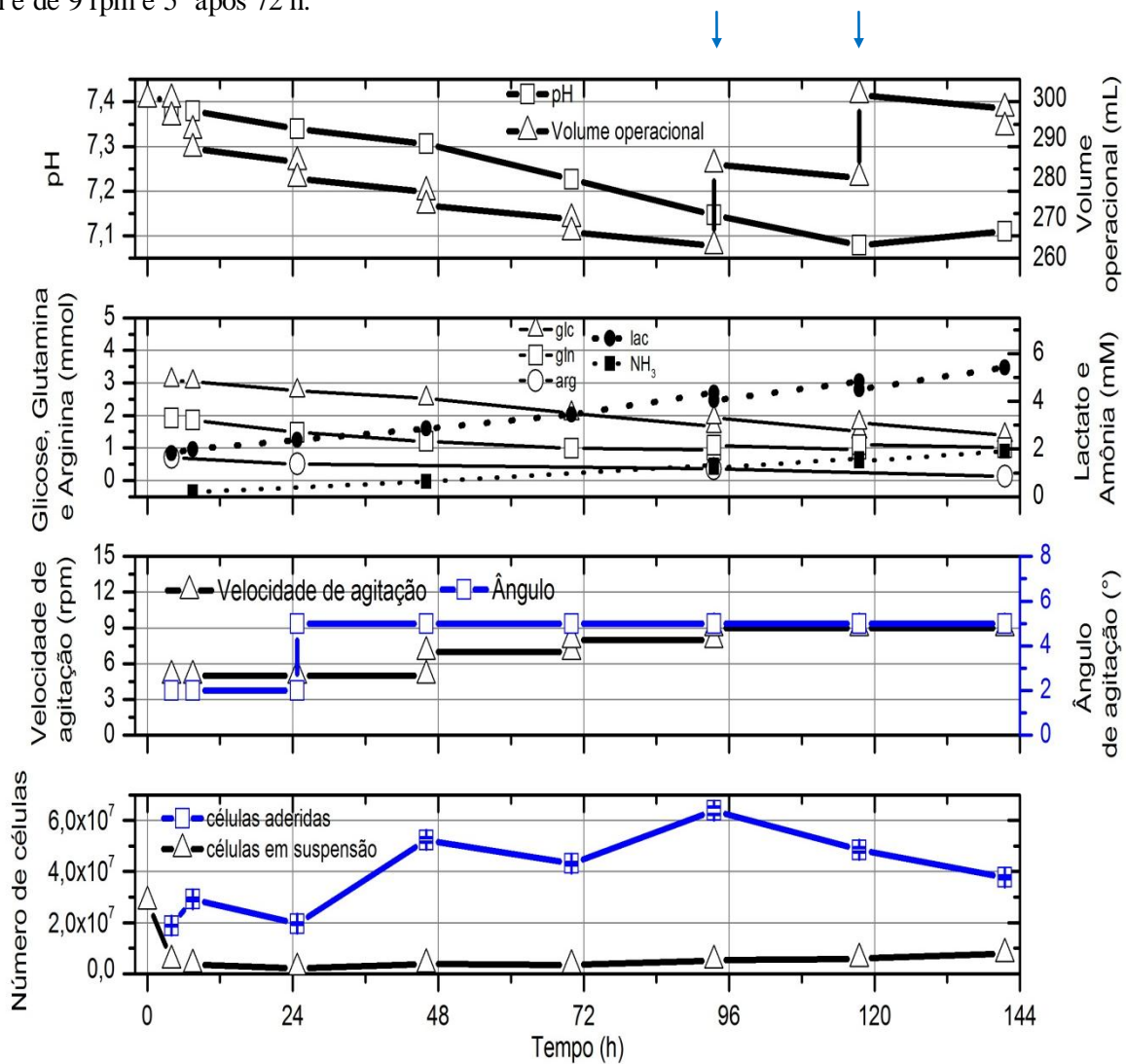
Akerström (2009) constatou a transferência de CEMs (hMSC-GFP e wt-hMSC) entre microcarregadores no biorreator Wave Sistema 2/10. Contudo, no Experimento 4 não houve transferência de células para os MCs vazios. As características de operação, por ser operado com 300 mL e o volume distribuído em uma superfície plana tornam o processo de transferência de células entre microcarregadores colonizados para microcarregadores com baixa densidade celular ainda mais difícil, já que o contato entre microcarregadores é reduzido. Além disso, a aplicação do sistema de vibração pode ter dificultado essa interação entre os microcarregadores colonizados e microcarregadores vazios, aumentando a dificuldade do processo de transferência de células.

O fator de expansão foi de 2,25, com velocidade de crescimento específica máxima de $0,012 \text{ h}^{-1}$. A concentração de arginina era de 1,370 mM com 96 h e atingiu 0,422 mM com 144 h. Assim como no Experimento 3, não houve esgotamento de glicose ou glutamina e a concentração de lactato e amônia não atingiram níveis inibitórios, porém houve esgotamento de arginina. A adesão não homogênea, provocando rápida saturação dos MCs, juntamente com a deposição dos MCs nas regiões extremas da Cellbag e o esgotamento de

5. RESULTADOS

arginina após 96 h de operação podem ter contribuído para o curto período de crescimento, sendo o máximo de densidade celular obtido com 96 h.

Figura 25 - Experimento 4 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de meio de cultivo com 96 e 120 h (indicado por seta). A agitação da plataforma foi de 5 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 5° após 24 h e de 9 rpm e 5° após 72 h.



5.3. Estratégias para elevar o fator de expansão celular: Cellbag com área de superfície molhada reduzida durante todo o cultivo - Adição de microesferas de alginato - Aplicação do aditivo Anti-Clumping

Com objetivo de evitar a adesão dos MCs nas regiões extremas da Cellbag observada nos experimentos anteriores avaliou-se operar durante todo o cultivo com a área de superfície molhada reduzida (Experimento 5). O experimento 5 apresentou o maior FE obtido entre os estudos realizados, contudo verificou-se a formação de MCs em aglomerados estagnados na região central do líquido, o que promoveu a queda da viabilidade do cultivo. Para solucionar tal problema, realizou-se dois experimentos visando reduzir a formação dos grumos de MCs. As alternativas testadas foram a adição de microesferas de alginato de cálcio com intuito de evitar a formação de grumos de MCs, pela interposição das MA entre os MCs, e adição no meio de cultivo de Anti-Clumping (GIBCO, EUA) em relação 1:10⁴ v/v (técnica utilizada para modular a agregação, Luna, 2014)

Experimento 5

No Experimento 5 a Cellbag foi inoculada com 8,23x10⁴ cel/mL e 2,5 gMC/L, resultando em 41,2 células por microcarregador. Utilizou-se meio de cultivo α -MEM com a mesma suplementação dos Experimentos 2 à 4. O volume inicial de trabalho de 300 mL foi restringido por apoios resultando na relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 1,27. Como nos experimentos anteriores, e mesmo com a utilização do sistema de vibração no Experimento 4, se constatou adesão dos MCs nas regiões extremas da Cellbag devido ao movimento do fluido ir depositando gradativamente os MCs nas extremidades onde o líquido alcança, a posição reduzida foi mantida durante toda a operação, o que possibilitou contornar tal problema.

O experimento foi operado com adição de 25 mL de meio de cultivo, 4 vezes concentrado comparado ao meio inoculado, com 72, 96, 144 e 168 h. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 5° até 96 h e de 15 rpm e 6° após 120 h. Após 8 h de cultivo a totalidade das células inoculadas estavam aderidas aos MCs (Figura 26).

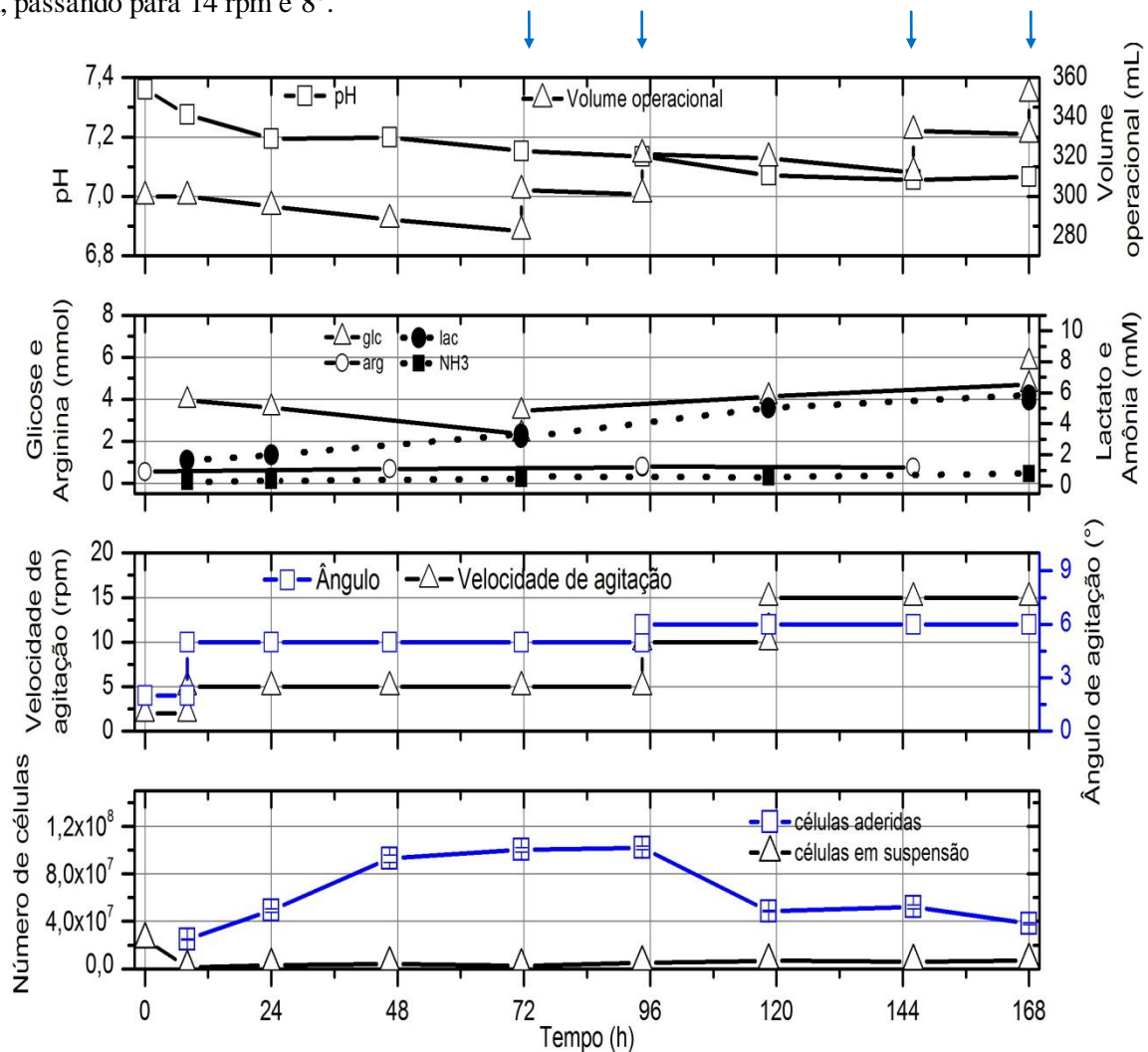
O fator de expansão foi de 4,1, com velocidade de crescimento específica máxima de 0,021 h⁻¹. A concentração de lactato atingiu 5,86 mM com 72 h de operação, nível bem abaixo do inibitório ao cultivo. Os níveis de glicose e arginina não comprometeram o processo, estando a concentração de arginina em 2,405 mM com 144 h de operação. A

5. RESULTADOS

concentração de amônia atingiu 0,80 mM com 96 h de operação, valor ainda abaixo do nível inibitório de 2,4 mM, sendo a concentração máxima obtida de 2,11 mM com 168 h.

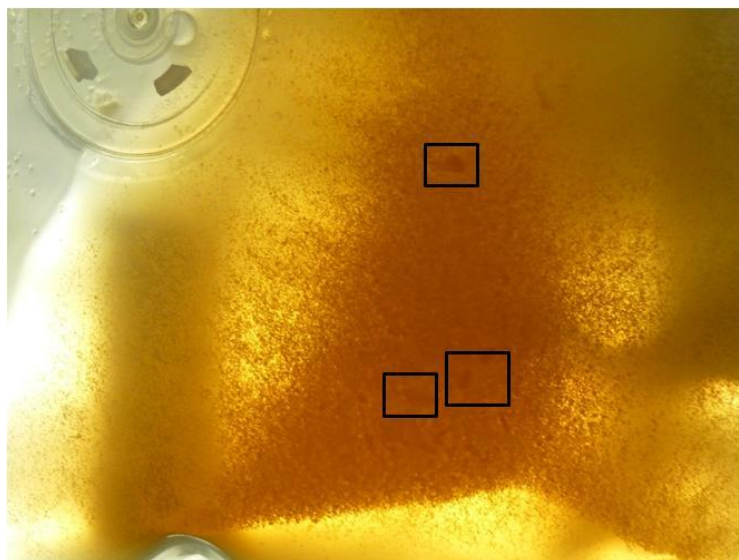
Com 72 h ocorreu formação de aglomerados de MCs na região central da Cellbag, o que pode ter promovido a interrupção da expansão do cultivo devido à limitação de nutrientes nas regiões onde os MCs estavam estagnados. A Figura 27 apresenta a imagem dos aglomerados de MCs existentes com 144 h com a agitação já elevada na tentativa de reduzir os aglomerados formados a partir de 72 h.

Figura 26 - Experimento 5 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de 25 mL de meio de cultivo concentrado (4 vezes concentrado comparado ao meio inoculado) com 72, 96, 144 e 168 h (indicado por seta). A plataforma foi mantida durante todo o cultivo com área de superfície molhada reduzida. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 2° até 96 h, 10 rpm e 4° até 48 h, passando para 14 rpm e 8°.



5. RESULTADOS

Figura 27 - Experimento 5 - Imagem dos microcarregadores no fundo da cellbag com 144 h. Em destaque a formação de aglomerados de microcarregadores.

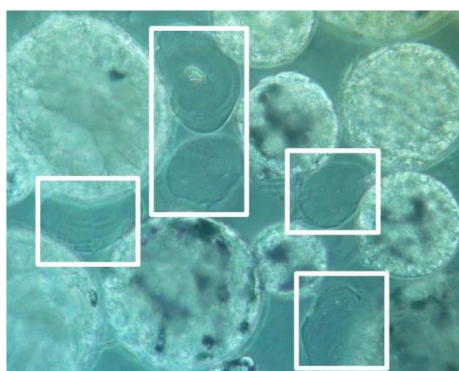


Fonte: acervo pessoal.

Experimento 6

A Cellbag foi inoculada com $8,4 \times 10^4$ cel/mL e 3,0 gMC/L, resultando em 34,9 células por microcarregador. Empregou-se meio de cultivo α -MEM com a mesma suplementação dos Experimentos 2 à 5. O volume inicial de trabalho de 250 mL foi restringido por apoios laterais colocados na plataforma, resultando na relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 1,27. A adição das microesferas de alginato foi realizada com 29 h de operação em 50 mL de meio de cultivo contendo $6,0 \times 10^5$ partículas de MA, resultando em uma relação de 1:1 ao número de partículas de MCs inoculados. A Figura 28 apresenta as microesferas de alginato entre os microcarregadores.

Figura 28 – Imagens dos microcarregadores e das microesferas de alginato (em detalhe) obtidas por microscopia ótica para o Experimento 6. Magnificação de 200x.



Fonte: acervo pessoal.

5. RESULTADOS

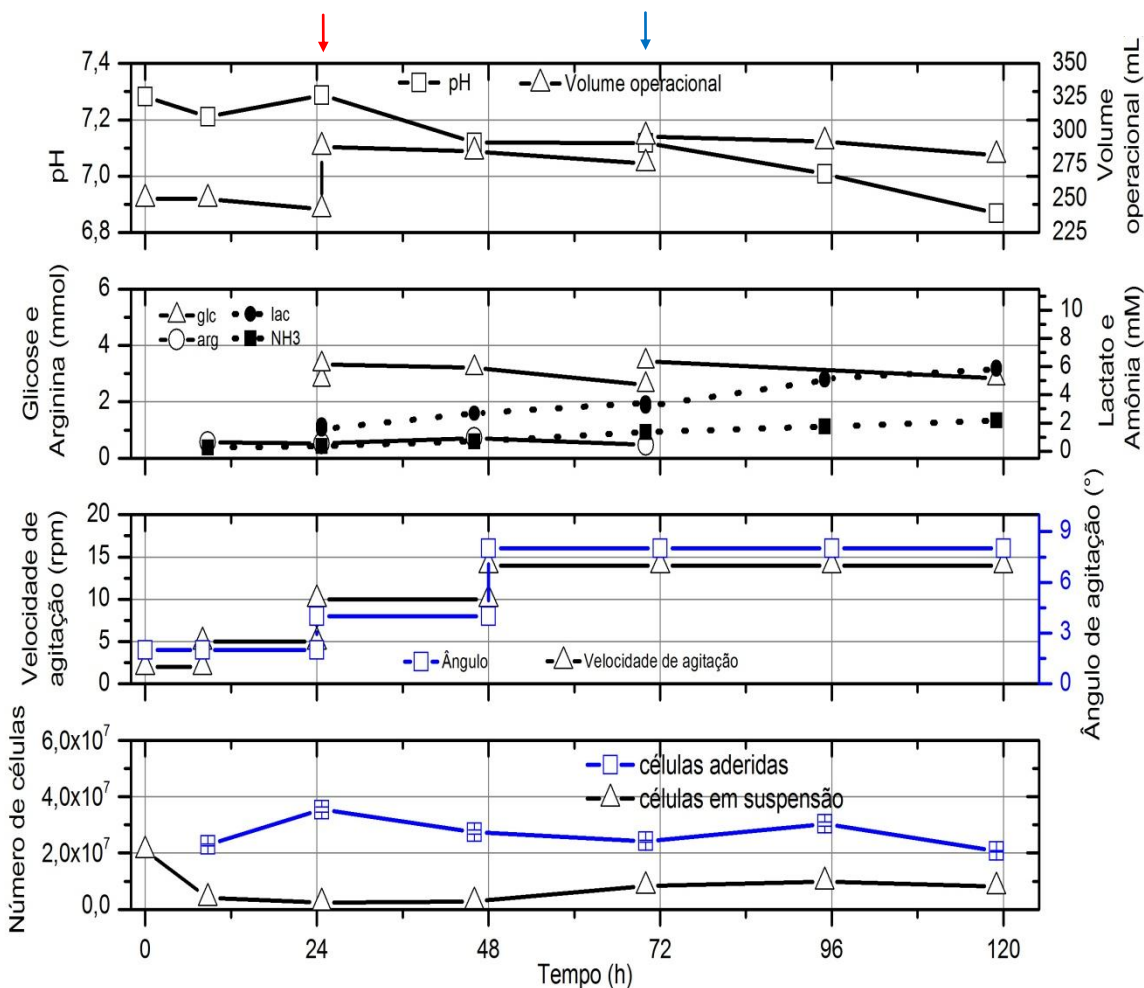
O experimento foi operado com adição de 25 mL de meio de cultivo, 3 vezes concentrado comparado ao meio inoculado, com 72 h. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 2° até 24 h, 10 rpm e 4° até 48 h, passando para 14 rpm e 8° no restante da operação (Figura 29).

O Experimento 6 apresentou crescimento apenas até 24 h (Figura 30), ponto antes da adição das MA (realizada com 29 h). Com 48 h de operação todos os microcarregadores estavam concentrados em bloco único na região central da Cellbag (Figura 31). A adição das MA e a agitação maior empregada quando comparada ao Experimento 5 não produziram desempenho melhor, já que no Experimento 5 a formação de grumos de MCs foi observada com 72 h. Tal fato pode estar relacionado à liberação de íons Ca^{+2} que formam as MA para o meio de cultivo, o que promove ligações célula-célula elevando a agregação dos MCs (Sart et al., 2014).

Após a verificação da aglomeração intensa dos MCs a velocidade de agitação foi elevada para 14 rpm e 8°, a qual se mostrou eficiente em reduzir a formação dos grumos de MCs, porém se constatou elevação do número de células em suspensão, o que pode estar relacionado ao choque entre as MA e os MCs, resultando na desadesão das células na parte externa dos MCs, as quais já poderiam se encontrar em condições metabólicas não ideais devido ao stress provocado pela aglomeração dos MCs entre 24 e 48 h. Sendo assim, o grande aglomerado de MCs formado resultou na queda da viabilidade do cultivo, a qual não foi recuperada mesmo após adição de meio concentrado com 72 h.

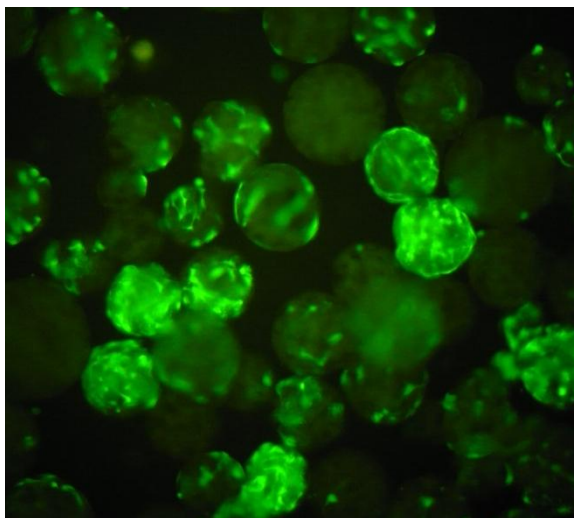
5. RESULTADOS

Figura 29 - Experimento 6 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Adição de MA em relação 1:1 ao número de partículas de MCs com 29 h (seta vermelha). Operado com adição de meio de cultivo concentrado (3 vezes concentrado comparado ao meio inoculado) com 72 h (seta azul). A plataforma foi mantida durante todo o cultivo com área de superfície molhada reduzida. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 2° até 24 h, 10 rpm e 4° até 48 h, passando para 14 rpm e 8°.



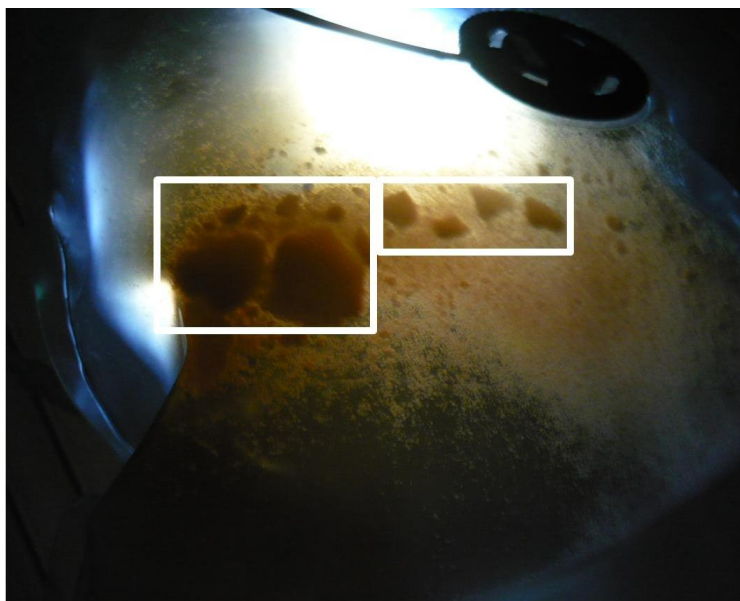
5. RESULTADOS

Figura 30 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica para o Experimento 6 com 24 h de operação. Magnificação de 100x.



Fonte: acervo pessoal.

Figura 31 - Experimento 6 - Imagem dos microcarregadores no fundo da cellbag com 48 h. Em destaque os microcarregadores aglomerados na região central da Cellbag.



Fonte: acervo pessoal.

Experimento 7

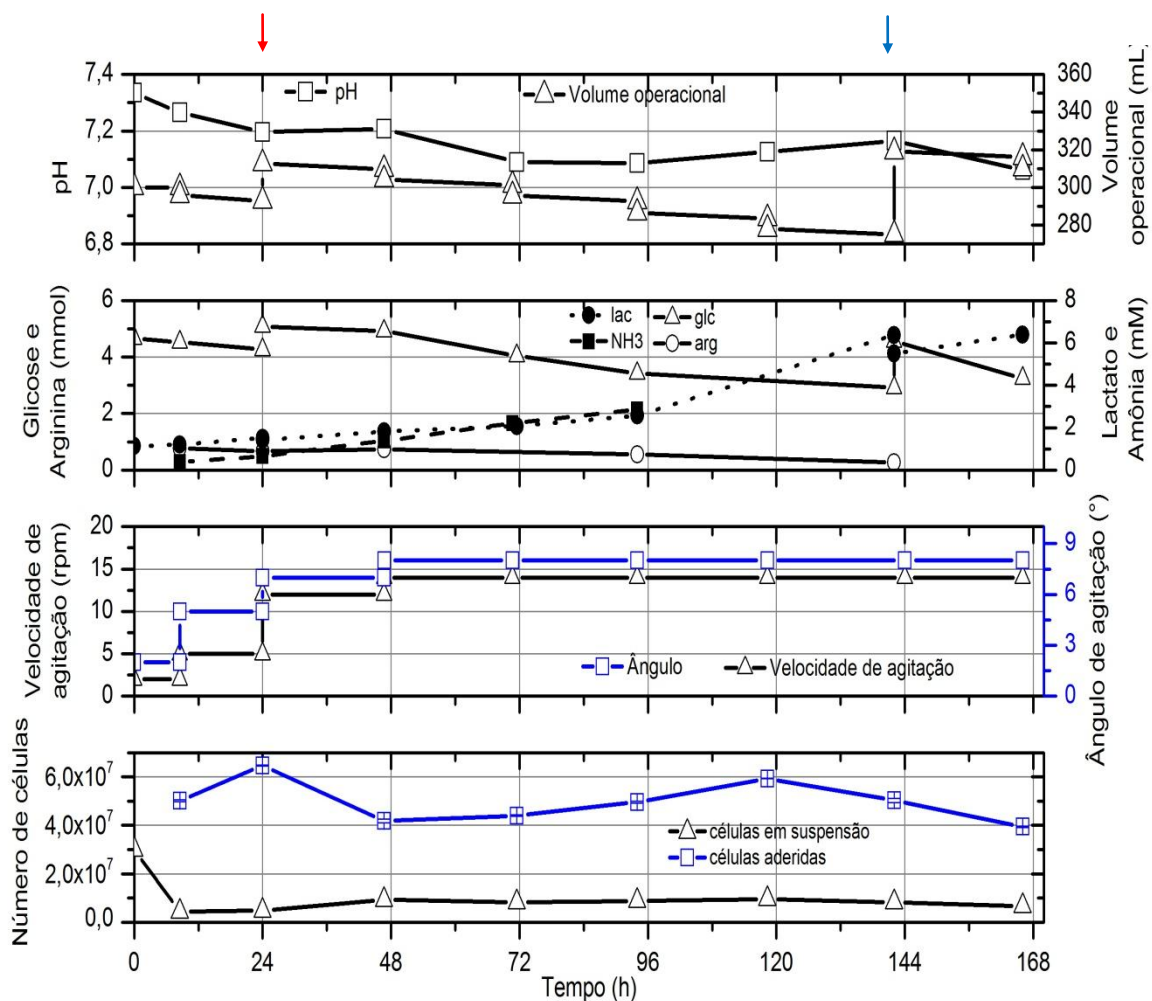
No experimento 7 a Cellbag foi inoculada com $1,0 \times 10^5$ cel/mL e 2,5 gMC/L, resultando em 50 células por microcarregador. O volume inicial de trabalho aplicado foi de 300 mL e assim como os anteriores, restringido por apoios laterais colocados na plataforma, resultando na relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 1,27. A adição de Anti-Clumping foi feita com 29 h em meio α -MEM 3 vezes concentrado quando comparado ao meio inoculado e com concentração de Anti-Clumping de $1,197:10^3$ v/v a fim de que o meio da Cellbag apresentasse $1:10^4$ v/v do aditivo em relação ao volume de trabalho após a primeira adição, concentração que apresentou bom resultado no controle da agregação dos MCs em biorreator spinner (Luna, 2014). O aditivo Anti-Clumping é um composto quimicamente definido, não apresenta na formulação proteínas, enzimas, hidrolisados ou componentes de composição desconhecida (GIBCO, EUA).

Nos experimentos anteriores se constatou que há dificuldade em se obter uma distribuição homogênea das células na fase de adesão, o que resulta em MCs sem células ou com poucas células. Tal situação pode estar relacionada à formação de camadas de MCs que não entram em contato com as células. Sendo assim, no Experimento 7 durante a fase de adesão, primeiras 8 h de operação, a agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° , sendo que a cada 40 min a agitação era elevada para 14 rpm e 8° durante 2 min a fim de possibilitar a renovação da camada superior de MCs. Após, aplicou-se agitação de 5 rpm e 2° até 24 h, 10 rpm e 4° até 48 h, passando para 14 rpm e 8° no restante da operação, a fim de melhorar a dispersão dos MCs (Figura 32).

Com 168 h de operação se realizou a medição do percentual de saturação do meio de cultivo com ar utilizando a sonda de oxigênio para monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido compatível com a Cellbag (DOOPT-Probe - GE). A medição obtida pelo sistema de controle apresentou 100% de saturação, o que comprova que não há limitação do processo pela concentração de oxigênio dissolvido.

5. RESULTADOS

Figura 32 - Experimento 7 - Cultivo da linhagem hMSC-TERT em meio de cultura α -MEM suplementado com glicose, glutamina e arginina, antibiótico (10% v/v), SFB (15% v/v) e 24 mM de bicarbonato de sódio. Operado com adição de meio de cultivo concentrado com Anti-Clumping (3 vezes concentrado comparado ao meio inoculado) com 29 h (seta vermelha). Adição de meio de cultivo não concentrado e sem Anti-Clumping com 144 h (seta azul). A plataforma foi mantida durante todo o cultivo com área de superfície molhada reduzida. A agitação da plataforma foi de 2 rpm e 2° nas primeiras 8 h de operação, passando para 5 rpm e 5° e ao máximo de 14 rpm e 8° após 48 h.

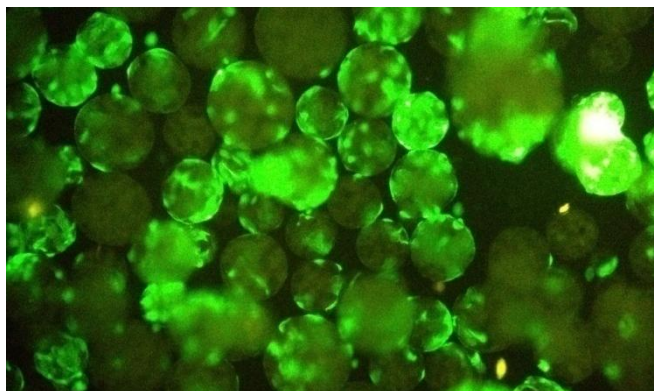


A agitação aplicada na fase de adesão promoveu melhor distribuição das células nos microcarregadores quando comparado aos experimentos anteriores, conforme apresentado na Figura 33. Com 24 h o FE obtido foi de 2,16. Após a adição do meio contendo Anti-Clumping com 29 h de operação a viabilidade do cultivo caiu, sendo que a densidade de células aderidas com 24 h ficou próxima a ser restabelecida apenas com 120 h. No período de tentativa de restabelecimento do cultivo, entre 48 e 120 h, a velocidade específica de

5. RESULTADOS

crescimento foi baixa, com valor máximo de $0,008 \text{ h}^{-1}$. Com 144 h de operação foi realizada adição de 50 mL de meio de cultivo sem Anti-Clumping e não concentrado, porém o cultivo não apresentou recuperação no ponto seguinte.

Figura 33 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica no fim da fase de adesão no Experimento 7. Magnificação de 100x.

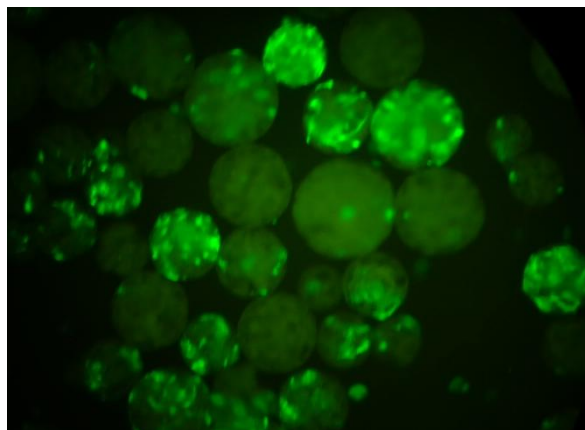


Fonte: acervo pessoal.

A presença do agente Anti-Clumping pode ter provocado a desadesão das células e morte celular, visto que o número de células em suspensão com 48 h foi de 22% com relação ao número de células aderidas aos microcarregadores e se manteve com média de 17,2% no restante do cultivo. No Experimento 5, no qual obteve-se o melhor desempenho, esse valor não ultrapassou 6% até 120 h. As imagens de fluorescência após a adição de Anti-Clumping mostram muitos microcarregadores sem células (Figura 34). Conforme verificado na Figura 30, com o baixo crescimento, o nível de glicose não comprometeu o processo e a concentração de lactato se manteve baixa. A concentração de amônia era de 0,65 mM com 24 h e atingiu 1,39 mM com 48 h e 2,21 mM com 72 h, valor já próximo ao inibitório, chegando a 2,86 mM com 96 h, valor tóxico para as CEMs.

5. RESULTADOS

Figura 34 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica com 48 h de operação no Experimento 7 (após a adição de Anti-Clumping). Magnificação de 100x.



Fonte: acervo pessoal.

O agente Anti-clumping juntamente com a velocidade de agitação empregada foram eficientes em evitar a formação dos grumos de MCs nos tamanhos verificados nos experimentos anteriores (Figura 35), porém o cultivo apresentou baixo FE. A adição do meio com Anti-Clumping com 29 h de operação, juntamente com a elevada concentração de amônia podem ter provocado o baixo rendimento do cultivo.

Figura 35 - Experimento 7 - Imagem dos microcarregadores dispersados no fundo da cellbag com 72 h de operação.

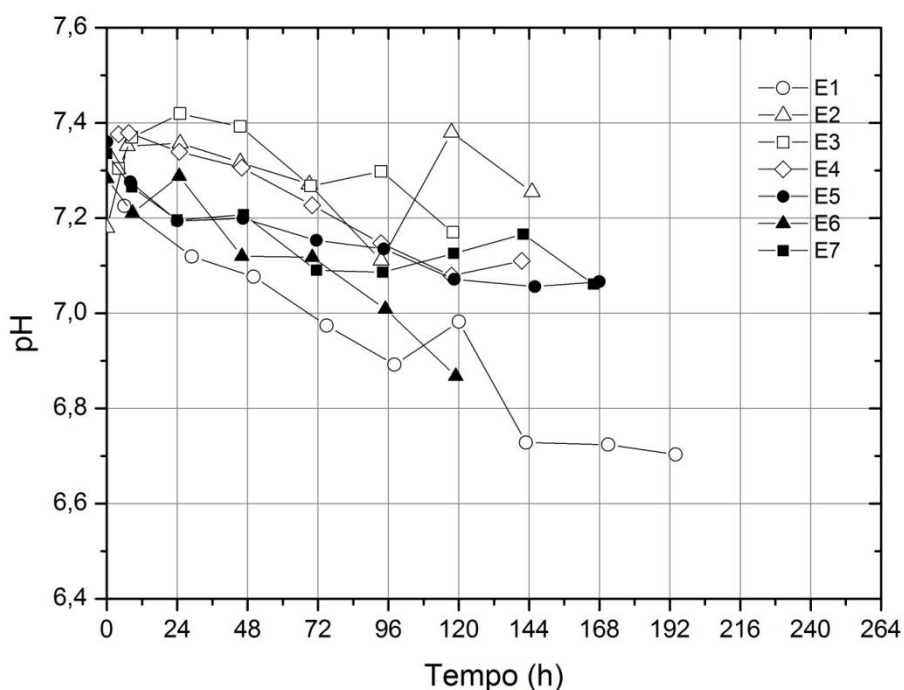


Fonte: acervo pessoal.

5.4. Avaliação dos resultados obtidos no controle de pH, aperfeiçoamento da fase de adesão e da fase de crescimento

A Figura 36 apresenta a variação do pH no decorrer dos cultivos realizados. A partir do Experimento 2, em que o meio de cultivo foi suplementado com 24 mM de bicarbonato de sódio foi possível manter o controle do pH na faixa desejável sem ser necessário realizar intervenções no cultivo, como trocas de meio. O Experimento 6 foi o que apresentou maior queda de pH entre os experimentos operados com 24 mM de bicarbonato de sódio, atingindo 6,86 com 120 h, o que pode estar relacionado ao processo de morte celular do cultivo.

Figura 36 - Variação do pH nos cultivos realizados. E1: cultivo com meio suplementado com 15 mM de bicarbonato de sódio e adição de meio entre 48 e 192 h. E2, E3, E4, E5, E6 e E7: cultivos com meio suplementado com 24 mM de bicarbonato de sódio e adição de meio: E2 com 96 h, E3 com 72 h, E4 com 96 e 120 h, E5 com 72, 96, 144 e 168 h, E6 com 29 e 72 h, E7 com 29 e 144 h.

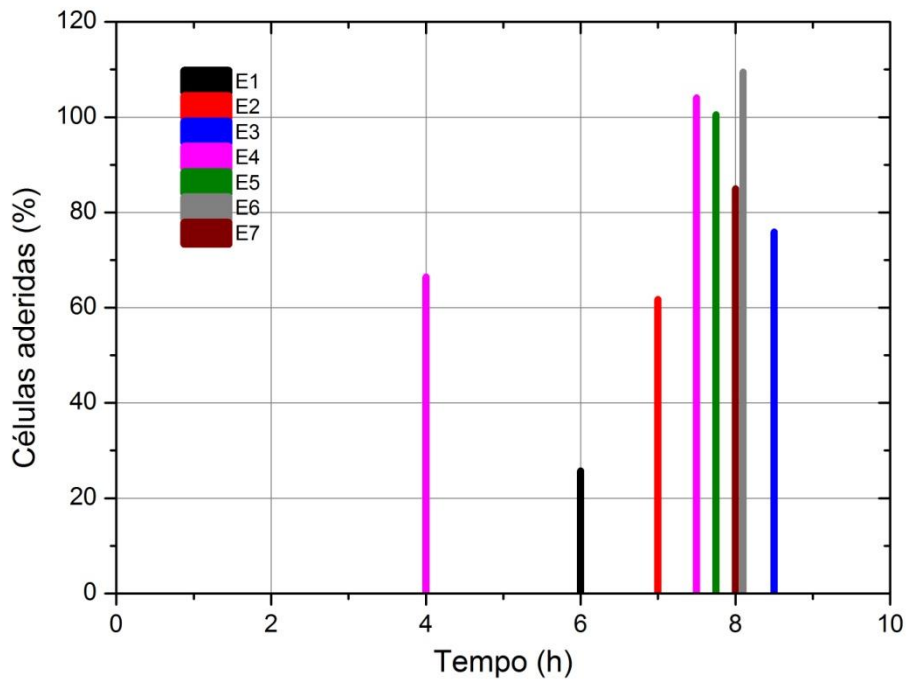


Com relação à eficiência da fase de adesão célula-microcarregador, os experimentos realizados com redução da área de superfície molhada apresentaram melhores resultados. Os Experimentos 3 à 7 realizados com relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ modificada pela redução da área de superfície molhada apresentaram melhores resultados de adesão

5. RESULTADOS

comparados aos Experimentos 1 e 2, que foram operados sem reduzir a área da Cellbag durante a fase de adesão (Figura 37).

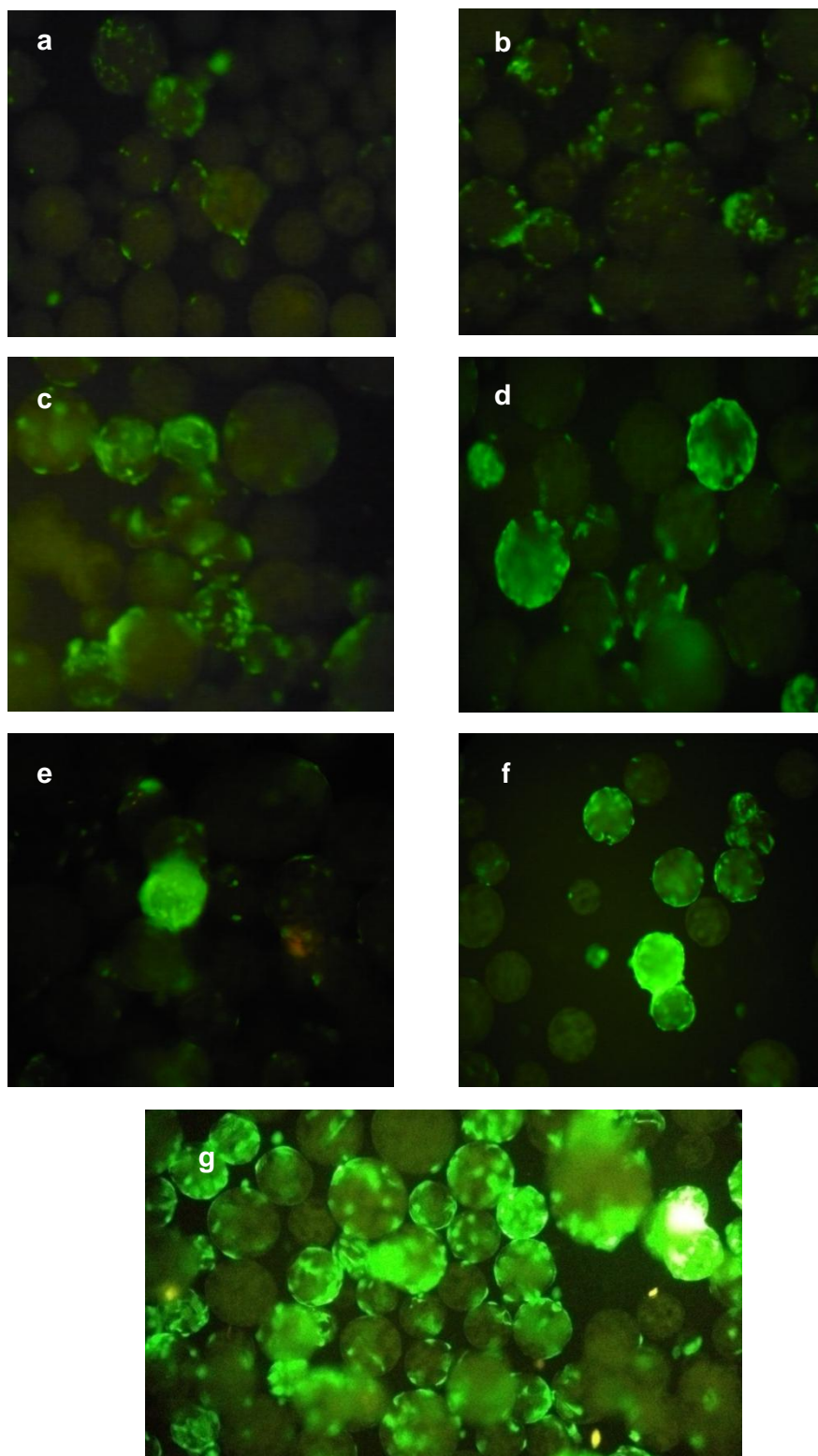
Figura 37 – Percentual de células aderidas aos microcarregadores nos cultivos realizados, tendo como base o número de células inoculadas. E1 e E2 com relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 0,77, E3 com relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 3,07 e E4, E5, E6 e E7 com relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 1,27.



Nos Experimentos 1 e 2 a grande perda das células inoculadas, possivelmente aderidas no fundo da Cellbag, resultou em baixa colonização dos microcarregadores. Nos Experimentos 3 - 5 a colonização dos microcarregadores no término da fase de adesão foi desigual. Tal problema de distribuição das células sobre os microcarregadores no término da fase de adesão foi minimizado no Experimento 7, em que se aplicou elevação da velocidade de agitação da plataforma em intervalos de tempo de 40 min a fim de permitir a renovação da camada externa de MCs, resultando em distribuição mais homogênea, como se pode verificar na Figura 38.

5. RESULTADOS

Figura 38 – Imagens de fluorescência dos microcarregadores obtidas por microscopia ótica no fim da fase de adesão para: E1 (a), E2 (b), E3 (c), E4 (d), E5 (e), E6 (f) e E7 (g). Magnificação de 100x.



Fonte: acervo pessoal.

5. RESULTADOS

A eficiência da fase de adesão célula-microcarregador é crucial para não afetar o processo e obter bom desempenho na fase de crescimento exponencial. A adesão é dependente de diferentes fatores, como linhagem celular, modelo de microcarregador e meio de cultivo empregado (Chase e Vemuri, 2012). Schop et al. (2010) obtiveram no cultivo da linhagem human BM-MSC com microcarregador CytodexTM-1 adesão de 57% em meio suplementado com SFB, já Eibes et al. (2010) obtiveram adesão de 100% com microcarregador CultiSpher-S® para a mesma linhagem celular também suplementando o meio com SFB. Com relação aos trabalhos sobre o cultivo de CEMs no biorreator Wave Sistema 2/10, Akerström (2009) realizou a fase de adesão em frascos-T com MC Cytodex-3 e após inoculou a Cellbag e Timmins et al (2012) utilizaram MC Cultispher-S e apenas obtiveram bons resultados quando a operação foi realizada em hipóxia. Sendo assim, o processo de redução da área de superfície molhada da Cellbag foi eficiente na melhora do desempenho da fase de adesão. Os Experimentos operados com redução da área de superfície molhada da Cellbag (Experimentos 3 - 7) visando obter 100% das células aderidas aos MCs mostram que é possível realizar a etapa de adesão de forma efetiva na Cellbag e sem operar em hipóxia, condição que não foi alcançada nos trabalhos de Akerström (2009) e Timmins et al (2012).

O Experimento 5, operado com redução da área de superfície molhada da Cellbag durante todo o cultivo para evitar a adesão dos MCs nas regiões extremas da Cellbag, apresentou o melhor desempenho, com FE de 4,1, sendo interrompido devido à formação de grumos de MCs no fundo da Cellbag com 72 h de operação. Akerström (2009) obteve FE de 6 vezes em 18 d e Timmins et al (2012) de 16 vezes em 7 d o que, juntamente com os dados obtidos nos experimentos realizados, mostra ser possível almejar maiores FE realizando o cultivo sempre em sistema fechado (etapa de adesão na Cellbag) com operação em pressões mais baixas de oxigênio dissolvido.

Os experimentos realizados a fim de evitar a formação de grumos de MCs na região central da Cellbag (constatada no Experimento 5) e então permitir maior FE do cultivo, Experimento 6 (adição de microesferas de alginato de cálcio) e Experimento 7 (adição de meio com Anti-Clumping) apresentaram queda da viabilidade do cultivo com 48 h de operação devido às conseqüências geradas pelas alternativas estudadas com intuito de reduzir os grumos de microcarregadores, às quais foram operadas após 24 h de processo.

Os procedimentos de adição de microesferas de alginato de cálcio e adição de meio com Anti-Clumping foram efetivos em controlar a formação dos agregados de MCs em

5. RESULTADOS

biorreator spinner (Mendonça, 2013; Luna, 2014). Contudo, tais procedimentos provocaram a queda da viabilidade do cultivo no biorreator Wave, o que pode estar vinculado às diferenças hidrodinâmicas entre o biorreator spinner e o biorreator Wave, o qual apresenta um ambiente de cultivo heterogêneo devido à segregação dos MCs em regiões da Cellbag, o que também pode alterar as condições fisiológicas das CEMs, deixando-as mais sensíveis às condições de operação.

A Tabela 3 apresenta uma síntese das condições de operação e os dados obtidos do percentual de adesão célula-microcarregador, velocidade específica de crescimento, fator de expansão e relação de produção de lactato por glicose consumida e produção de amônia por glutamina consumida para os experimentos realizados.

Tabela 3 – Resumo de condições utilizadas e resultados obtidos no conjunto de experimentos realizados neste trabalho.

Parâmetro	Experimento						
	1*	2*	3*	4	5	6	7
X_0 (cel/mL)	1,0E5	1,0E5	7,50E4	9,45E4	8,23E4	8,39E4	1,0E5
$V_{inicial}$ (mL)	300	300	300	300	300	250	300
N_{cel}/N_{MC} (N_{cel}/N_{MC} com relação às células aderidas)	50 (13)	50 (31)	50 (38)	47	41	35	50
$A_{MC}/A_{SMCellbag}$	0,77	0,77	3,07	1,27	1,27	1,27	1,27
Adesão (%) (h)	25,7 (6 h)	61,7 (7 h)	75,9 (8,5 h)	104,1 (7,5 h)	100,5 (7,7 h)	109,5 (8,1 h)	85,0 (8 h)
μ (h^{-1})	0,026	0,021	0,010	0,012	0,021	0,027	0,032
t_d (h)	26,7	33,0	69,31	57,8	33,0	25,7	21,66
FE (FE com relação às células aderidas)	2,61 (10,26)	1,84 (3,37)	2,32 (3,05)	2,25	4,13	1,41	2,16
$Y_{lac/gli}$ (mol/mol)	0,93	1,08	0,60	0,52	0,27	0,29	0,33
$Y_{NH_3/glu}$ (mol/mol)	0,54	0,20	0,16	0,19	ND	ND	ND

Dados literatura: $Y_{lac/glc}$ (mol/mol) = 2,0; $Y_{NH_3/gln}$ (mol/mol) = 1,63 (Schop, 2010).

ND: análises não determinadas.

*Experimentos 1, 2 e 3 com correção da relação N_{cel}/N_{MC} em função do número de células aderidas.

As baixas relações de produção de lactato e amônia quando comparados aos valores descritos na literatura ($Y_{lac/glc} = 2,0$ mol/mol e $Y_{NH_3/gln} = 1,63$ mol/mol - Schop, 2010) podem estar relacionados a alterações no metabolismo celular devido à possível condição de hipóxia predominante submetida ao elevado número de microcarregadores presentes nos

5. RESULTADOS

aglomerados (Santos et. al., 2010) juntamente com o fato de haver gradientes de concentração de metabólitos e nutrientes, o que caracteriza o sistema bifásico sólido - líquido (microcarregador - meio de cultura) em estudo.

Analisando as relações de $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ aplicadas e o percentual de células aderidas no término da fase de adesão percebe-se que com a operação com área de superfície molhada da Cellbag reduzida, $A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 1,27, foi efetiva em obter a totalidade das células aderidas aos microcarregadores. A relação de 50 células por microcarregador promove saturação dos MCs, intensificada pela distribuição não homogênea das células sobre os MCs na fase de adesão, o que provoca maior produção de matriz extra-celular e aumenta a aglomeração dos MCs, o que pode ter resultado no baixo rendimento dos experimentos (Ng; Berry; Butler, 1996).

O Experimento 1, no qual houve perda de células na fase de adesão, resultando em 13 células por MC, apresentou FE de 10 vezes (considerando o número de células aderidas no término da fase de adesão). Assim, o aumento do FE está relacionado à redução do número de células inoculadas por MC, assim como promover a distribuição homogênea das células sobre os MCs, operar o cultivo com a área de superfície molhada da Cellbag reduzida ($A_{MC}/A_{SMCellbag}$ de 1,27) para não haver perda de células na fase de adesão e adesão dos MCs nas regiões extremas, juntamente com o aprimoramento das alternativas estudadas para evitar a formação de agregados de MCs na região central do líquido. Nos trabalhos desenvolvidos no LATECC para cultivo de CEMs com microcarregador Cultispher-S e meio α -MEM suplementado com 15% v/v de SFB em biorreator spinner, tem-se obtido FE na ordem de 13 vezes (Mendonça, 2013; Luna, 2014) o que evidencia que o biorreator Wave é forte candidato no desenvolvimento de processos de cultivo de CEMs em larga-escala de acordo com as normas de BPF.

6. Conclusões

A análise dos resultados obtidos permite chegar às seguintes conclusões:

1. Com o decorrer do cultivo a produção de matriz extracelular gera a formação de agregados de MCs e tende a dificultar a movimentação dos mesmos no líquido. O sensor de temperatura do biorreator gera uma pequena elevação na base da Cellbag, o que causa a retenção dos MCs nessa região. O movimento de ondas em apenas uma direção acaba não sendo eficiente na manutenção da distribuição homogênea dos MCs. Nesse sentido, o sistema de vibração acoplado na parte superior da Cellbag se mostrou efetivo em movimentar os MCs e em reduzir a adesão nas regiões extremas da Cellbag.
2. A área de superfície molhada, por ser distribuída de forma plana, reduz a relação entre $A_{MC}/A_{SMCellbag}$, o que permite que as células sedimentem sobre a Cellbag, e por consequência diminui a eficiência da fase de adesão célula-microcarregador. Sendo assim, a estratégia de reduzir a área de superfície molhada, aumentando a relação $A_{MC}/A_{SMCellbag}$, apresentou resultado efetivo na eficiência de adesão das células inoculadas.
3. O conjunto de dados obtidos revelou bom potencial do biorreator Wave para o cultivo de CEMs ao se obter valor de velocidade específica de crescimento na ordem de $0,026 \text{ h}^{-1}$, semelhante ao alcançado em outros sistemas convencionais de cultivo. O fator de expansão celular obtido nos experimentos, de 4,1 vezes com adesão de 100% e 41 células por MC e de 10 vezes considerando o número de células aderidas, com 13 células por MC, mostram que é possível alcançar elevado rendimento do cultivo, realizando a etapa de adesão na Cellbag.

6. CONCLUSÕES

4. A melhora da fase de crescimento é dependente de procedimentos que impeçam a concentração de MCs em determinadas regiões e a formação de depósitos de MCs nos extremos da Cellbag sem que o movimento provoque condições de estresse às células e a desadesão celular. Outro fator relevante está relacionado ao regime de renovação do meio de cultivo para que não ocorra redução da concentração de nutrientes e a concentração de metabólitos tóxicos não alcance níveis inibitórios.

5. Realizando uma análise geral do comportamento mostrado do biorreator Wave neste trabalho pode-se dizer que sua utilização na expansão de CEMs em larga escala é tecnicamente viável e que, apesar dos rendimentos celulares obtidos ainda serem ligeiramente inferiores aos de outros tipos de biorreatores de referência como o spinner, ainda apresenta potencial para superar este sistema de pequena escala.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestões para trabalhos futuros tem-se:

1. Analisar o comportamento do biorreator Wave em condição de hipóxia a fim de averiguar o efeito benéfico que a oxigenação baixa acarreta no desempenho do cultivo das CEMs no biorreator Wave.
2. Avaliar o sistema de vibração desenvolvido sendo acoplado na parte inferior da Cellbag, diretamente em contato com o meio de cultura, a fim de evitar a segregação dos microcarregadores em regiões do fluido sem que cause danos às células e as consequências desse fenômeno nas CEMs.
3. Estudar uma alternativa ao uso do hidrogel de alginato de cálcio que dispense o uso de cálcio para diminuir o grau de agregação celular e prolongar a fase de crescimento sadio, sem limitações nutricionais.
4. Realizar o cultivo das CEMs em Cellbag adaptada para operar em perfusão. Esse modelo de Cellbag permite realizar a troca do meio de cultivo, retirando o meio com metabólitos tóxicos e inserindo meio de cultura fresco, o que pode melhorar o desempenho da fase de crescimento.
5. Realizar o cultivo da linhagem primária de CEMs a fim de verificar se o processo de expansão em frascos-T e o cultivo na Cellbag avaliados para a linhagem contínua é aplicável à linhagem primária.
6. Estudar o comportamento do cultivo das CEMs na Cellbag com baixa relação entre o número de células inoculadas por número de microcarregadores.

Referências

- ABDALLAH, B. M., KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* v. 15, n. 2, p.109-16. 2008.
- AKERSTRÖM, H. Expansion of adherent cells for cell therapy. Uppsala University. 2009.
- ARRIETA, C. N., SILBERSTEIN, L. E. The identity and properties of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* v. 12, p. 126-131. 2011.
- BLECKWENN, N. A.; SHILOACH, J. Large-Scale Cell Culture. *Current Protocols in Immunology.* 2004.
- BUTLER, M. *Animal Cell Culture & Technology.* Second Edition. Bios Scientific Publishers. New York. 2004.
- CAPLAN, A. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology.* v. 213, p. 341-347. 2007.
- CAPLANA, S., BRUDERB, P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Arnold I.* v. 7, p. 259-264. 2001.
- DA SILVA, C. L., GONÇALVES, R., LEMOS, F., LEMOS, M. A., ZANJANI, E. D., ALMEIDA-PORADA, G., RODRIGUES, J. M. Modelling of ex vivo expansion/maintenance of hematopoietic stem cells. *Bioprocess Biosyst Eng.* v. 25, p.365-369. 2003.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, DJ., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* v. 8, n. 4, p.:315-317. 2006.
- DOS SANTOS, F., ANDRADE, P. Z., ABECASIS, M. M., GIMBLE, J. M., CHASE, L. G., CAMPBELL, A.M., BOUCHER, S., VEMURI, M. C., SILVA, C. L., CABRAL, J. M. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng Part C Methods.* v. 17, n. 12, p.1201-1210. 2011.
- DOS SANTOS, F., ANDRADE, P. Z., BOURA, J. S., ABECASIS, M. M., DA SILVA, C. L., CABRAL, J. M. S. Ex Vivo Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: A More Effective Cell Proliferation Kinetics and Metabolism Under Hypoxia. *J. Cell. Physiol.* v. 223: p. 27-35. 2010.

REFERÊNCIAS

- DOS SANTOS, F., ANDRADE, P. Z., DA SILVA, C. L., CABRAL, J. M. S. Scaling-up Ex Vivo Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Cellular Therapies. L.G. Chase and M.C. Vemuri (eds.), Mesenchymal Stem Cell Therapy, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. Springer Science & Business Media. New York. 2013.
- EIBES, G., DOS SANTOS, F., ANDRADE, P. Z., BOURA, J. S., ABECASIS, M. M., DA SILVA, C. L., CABRAL, J. M. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *J Biotechnol.* v. 146, n. 4, p. 194-197. 2010.
- EIBL, R.; EIBL, D. Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. *Plant tissue culture engineering.* Dutta Gupta and Yasuomi Ibaraki. Springer. 2008.
- EIBL, R., EIBL, D. Disposable Bioreactors. Springer. Berlin. 2009.
- EIBL, R., EIBL, D., PÖRTNER, R., CATAPANO, G., CZERMAK, P. Cell and Tissue Reaction Engineering. Springer. Berlin. 2009.
- EIBL, R., KAISER S., LOMBRISER R., EIBL D. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 86, p. 41-49. 2010.
- FRESHNEY, R. IAN. Culture of animal cells: a manual of a basic technique. Wiley-Liss. New York. 3 ed. 1994.
- GE Healthcare. Vaccine process development using Cytodex™ microcarriers in WAVE™ Bioreactor systems. GE Healthcare Bio-Sciences. Uppsala. 2010.
- GENZEL, Y., OLMER, R. M., SCHÄFER, B., REICHL, U. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine.* v. 24, p. 6074-6087. 2006.
- GRANT, J. L., SMITH, B. Bone marrow gas tensions, bone marrow blood flow, and erythropoiesis in man. *Ann Intern Med.* v. 58, p. 801-809. 1963.
- HENRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* V.136, p.65-74. 1984.
- HEWITT, C. J., LEE, K., NIENOW, A. W., THOMAS, R. J., SMITH, M., THOMAS, C. R. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnol Lett.* v. 33, n. 11, p. 2325-2335. 2011.

REFERÊNCIAS

- HUNDT, B., BEST, C., SCHLAWIN, N., KASSNER, H., GENZEL, Y., REICHL, U. Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave Bioreactor microcarrier culture in 1-10 L scale. *Vaccine*. v. 25, n. 20, p.:3987-3995. 2007.
- HUNT, M. M., ALFRED, R., RANCOURT, D. E., GATES, I. D., KALLOS, M. S. Bioprocess Development for the Expansion of Embryonic Stem Cells. InTech. 2011.
- KASTEN, P., BEYEN, I., EGERMANN, M., SUDA, A. J., MOGHADDAM, A. A., ZIMMERMANN, G., LUGINBÜHL, R. Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *European Cells and Materials*. V. 16, p. 47-55. 2008.
- KHANDAI, M.; CHAKRABORTY, S.; NAYAK, P.; KRISHNA, N. B. M.; CHAKRAVARTHI, G.; ACHARJYA, B.; GHOSH, A. K. Preparation and in vitro in vivo evaluation of aceclofenac loaded alginate microspheres: An investigation of effects of polymer using multiple comparison analysis. *Current drug delivery*. n.5, V. 9, p. 495-505, 2012.
- KNAZEK, R. A., GULLINO, P., KOHLER, P.O., DEDRICK, R. Cell culture on artificial capillaries. An approach to tissue growth *in vitro*. *Science*. V. 178, p. 65-67. 1972.
- JUNG, S.; PANCHALINGAM, K. M.; ROSENBERG, L.; BEHIE, L. A. Ex Vivo Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells in Defined Serum-Free Media. *Stem Cells International*. 2012.
- LE BLANC, K., FRASSONI, F., BALL L, LOCATELLI F, ROELOFS H, LEWIS I, LANINO E, SUNDBERG B, BERNARDO ME, REMBERGER M, DINI G, EGELER RM, BACIGALUPO A, FIBBE W, RINGDÉN O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. p. 1579-86. 2008.
- LIM, M., YE, H., PANOSKALTSIS, N., DRAKAKIS, E. M., YUE, X., CASS, A. E., RADOMSKA, A. & MANTALARIS, A. Intelligent bioprocessing for haematopoietic cell cultures using monitoring and design of experiments. *Biotechnol. Adv.* v. 25, p. 353-368. 2007.
- LUBINIECKI, A. S. Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology. Marcel Dekker. New York. 1990.

- LUNA, G. L. F. Avaliação de aditivos para modular a aglomeração de microcarregadores em cultivos de células mesenquimais estromais multipotentes em frasco spinner. Dissertação de Mestrado. UFSCar. 2014.
- MALGIERI, A., KANTZARI, E., PATRIZI, M. P., GAMBARDELLA, S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med*. V. 3, p. 248-269. 2010.
- MENDONÇA, M. L. Expansão de células mesenquimais estromais em frasco spinner e avaliação de aditivos para diminuir a aglomeração de microcarregadores. Dissertação de Mestrado. UFSCar. 2013.
- MIKOLA, M., SETO, J., AMANULLAH, A. Evaluation of a novel Wave Bioreactor Cellbag for aerobic yeast cultivation. *Bioprocess Biosyst Eng*. V. 30, p. 231-41. 2007.
- MORAES, A. M., AUGUSTO, E. P., CASTILHO, L. R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. Roca. São Paulo. 1 ed. 2008.
- NG, Y-C., BERRY, J. M, BUTLER, M. Optimization of Physical Parameters for Cell Attachment and Growth on Macroporous Microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 50, p. 627-635. 1996.
- NIRMALANANDHAN, V. S., SITTAMPALAM, G. S. Stem Cells in Drug Discovery, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: Emerging Opportunities and Challenges. *J Biomol Screen*. V. 14, p. 55-76. 2009.
- OHLSON, S., BRANSCOMB, J., NILSSON, K. Bead-to-bead transfer of Chinese hamster ovary cells using macroporous microcarriers. *Cytotechnology*. p. 67-80. 1994.
- PAULER, L., ANNERÉN, C. Culture of adherent cells on microcarriers in the Wave Bioreactor. GE Healthcare Bio-Sciences. Uppsala. 2008.
- PLACZEK, M. R., CHUNG, I. M., MACEDO, H. M., ISMAIL, S., MORTERA BLANCO, T., LIM, M., CHA, J. M., FAUZI, I., KANG, Y., YEO, D. C., MA, C. Y., POLAK, J. M., PANOSKALTSIS, N., MANTALARIS, A. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J R Soc Interface*. V. 6, p. 209-32. 2009.
- PORTNER, R. *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. Humana Press. New Jersey. 2 ed. 2007.
- RAWLINGS, B; PORA, H. A Prescriptive Approach to Management of Solid Waste from Single-Use Systems. *BioProcess International*. V. 7. 2009.

REFERÊNCIAS

RODRIGUES, C. A., FERNANDES, T. G., DIOGO, M. M., DA SILVA, C. L., RODRIGUES, J. M. Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnol Adv.* V. 29, p. 815-29. 2011.

SART, S., TSAI, A., LI, Y., MA, T. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. *Tissue Engineering.* V 20. 2014.

SCHAFFER, D., BRONZINO, J D., PETERSON, D. R. *Stem Cell Engineering: Principles and Practices.* CRC Press. Florida. 2012

SHAHDADFAR, A.; FRONSDAL, K.; HAUG, T.; P. REINHOLT, F.; BRINCHMANN, J. In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. *Stem Cells.* V. 23, p. 1357-1366. 2005.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial.* Vol. 2. Edgard Blücher. São Paulo. 2001.

SCHOP, D. Growth and metabolism of mesenchymal stem cells cultivated on microcarriers. Enschede, The Netherlands. 2010.

SCHOP, D., VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R., BORGART, E., JANSSEN, F. W., ROZEMULLER, H., PRINS. H. J., DE BRUIJN, J. D. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med.* v. 4, p. 131-40. 2010.

SERRA, M., BRITO, C., ALVES, P. M. Bioengineering strategies for stem cell expansion and differentiation. *CanalBQ.* n. 7. 2010.

SHEN, H. Stricter standards sought to curb stem-cell confusion - Initiative aims to clarify description of mesenchymal cells. *Nature.* v 499. p 389. 2013.

SHULER, M. L., KARGI, F. *Bioprocess Engineering. Basic Concepts.* Prentice Hall. New York. 2 ed. 2010.

SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology.* 1999.

SINGH, V. *The Wave Bioreactor Story.* Wave Europe Pvt. Ltd. 2005.

REFERÊNCIAS

TIMMINS, N. E., KIEL, M., GÜNTHER, M., HEAZLEWOOD, C., DORAN, M. R., BROOKE, G., ATKINSON, K. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng.* V. 109, p. 1817-26. 2012.

WAYMOUTH, C. Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In vitro.* V. 6, p. 109-127. 1970.

WEBER, W., WEBER, E., GEISSE, S., MEMMERT, K. Catching the Wave: The BEVS and the Biowave. *Animal Cell Technology.* V. 1, p. 335-337. 2001.

Apêndice 1. Curva padrão da análise de células viáveis pelo método MTT para os experimentos realizados.

Experimento 1

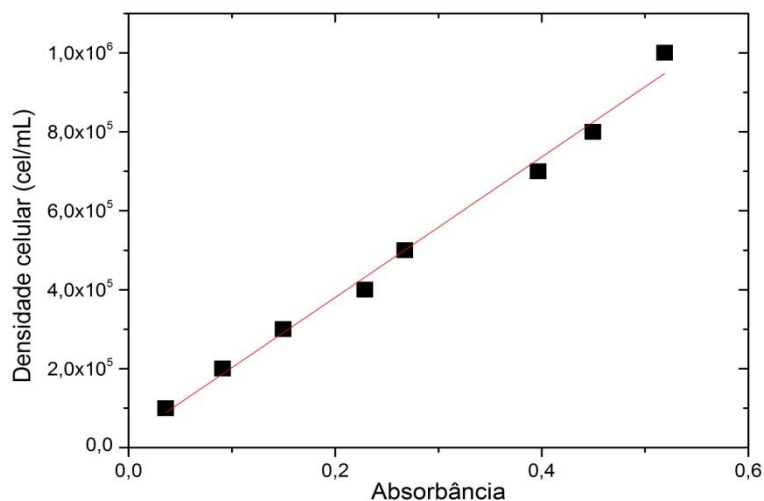


Figura 39 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 1. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 24753$), com coeficiente de correlação de 0,991.

Experimento 2

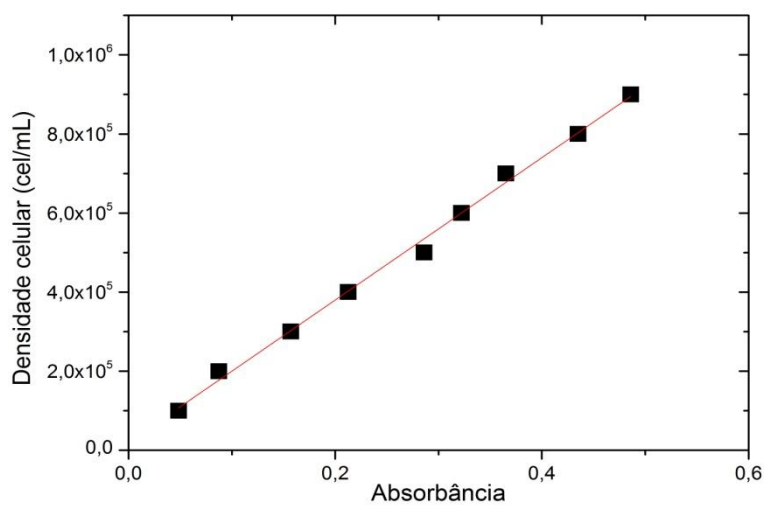


Figura 40 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 2. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 19754$), com coeficiente de correlação de 0,996.

Experimentos 3 e 4

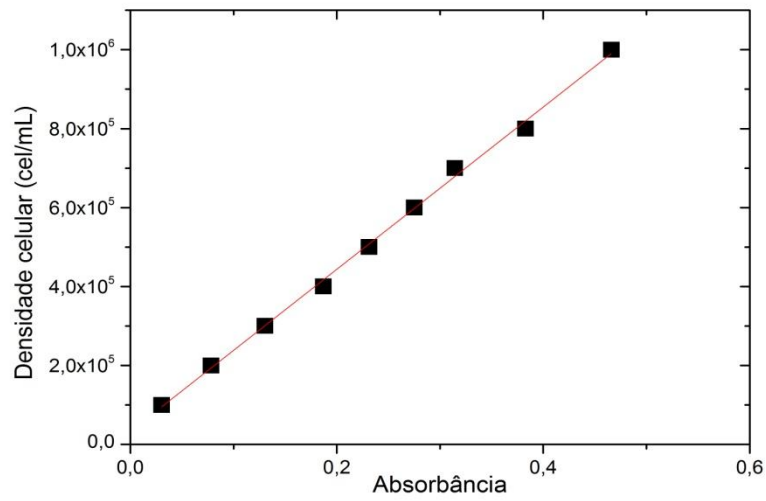


Figura 41 – Curva padrão da análise de MTT – Experimentos 3 e 4. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 32628$), com coeficiente de correlação de 0,998.

Experimento 5

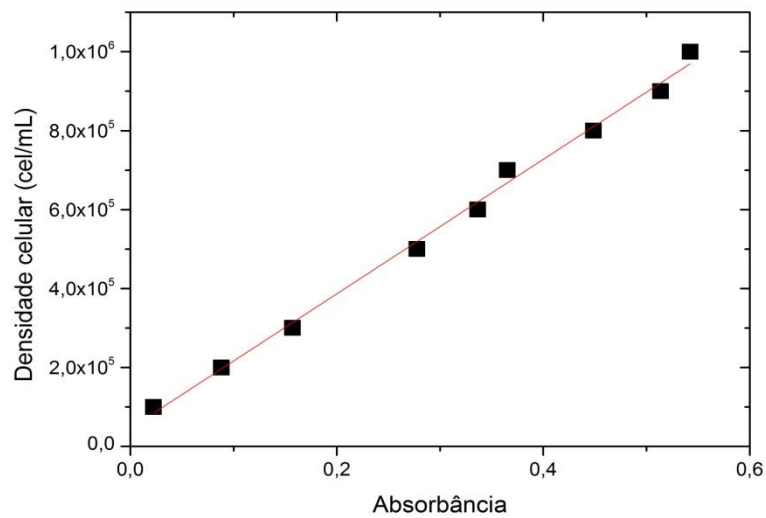


Figura 42 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 5. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 45982$), com coeficiente de correlação de 0,995.

Experimento 6

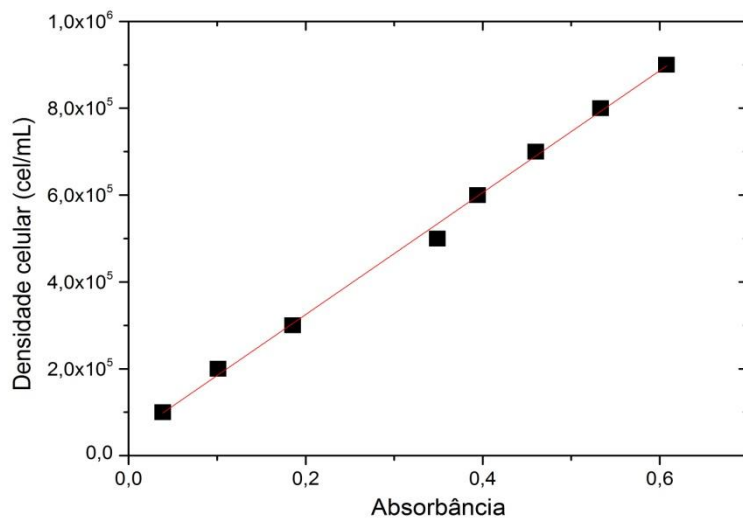


Figura 43 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 6. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 1E6$ e $b = 44141$), com coeficiente de correlação de 0,997.

Experimento 7

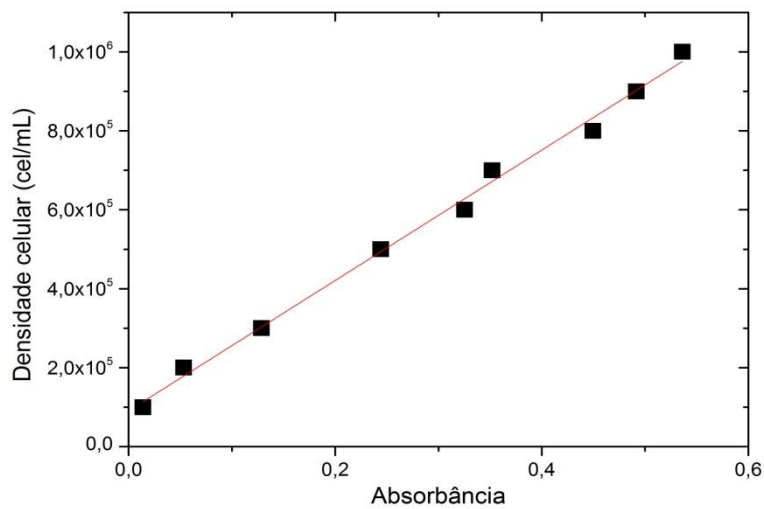


Figura 44 – Curva padrão da análise de MTT – Experimento 7. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2E6$ e $b = 90752$), com coeficiente de correlação de 0,995.

Apêndice 2. Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma; pH; porcentagem de CO₂ na entrada de gás da Cellbag; concentração de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia; número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão para os experimentos realizados.

Experimento 1

Tabela 4 – Experimento 1 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Desvio Padrão	Número de células em suspensão
6	7,72E+06	9,90E+04	1,01E+07
29	2,04E+07	4,89E+05	5,70E+06
50	3,57E+07	5,08E+05	2,36E+06
75	4,97E+07	1,22E+06	7,64E+06
120	7,89E+07	1,89E+06	8,44E+06
143	7,93E+07	1,71E+06	8,16E+06
171	3,05E+07	1,01E+06	9,99E+06
194	3,61E+07	1,18E+06	1,32E+07

Tabela 5 – Experimento 1 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Glutamina (mmol)	Arginina (mmol)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
0	3,33	1,35	0,77		
6	2,41	1,10		1,45	
29	2,13	0,95		2,40	0,34
50	2,26	0,87	0,61	3,60	0,50
75	2,62	1,13		5,22	
98	2,41	1,20	0,02	6,29	1,49
120	1,72	1,28		7,39	
143	1,51	1,21	0,02	8,27	2,22
171	1,14	1,43		8,52	
194	1,08	1,75	0,03	8,92	2,60

Tabela 6 – Experimento 1 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO₂ da atmosfera do meio de cultivo

Tempo (h)	CO ₂ (%)	pH	Agitação	
			rpm	ângulo
6	5,0	7,23	2	2
29	5,0	7,12	2	2
50	5,0	7,08	5	2
75	4,5	6,97	7	4
98	3,5	6,89	10	4
120	0,0	6,98	10	4
143	0,0	6,73	10	4
171	0,0	6,72	10	4
194	0,0	6,70	10	4

Experimento 2

Tabela 7 – Experimento 2 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Desvio Padrão	Número de células em suspensão
7	1,84E+07	4,10E+05	4,36E+06
25	2,57E+07	6,44E+05	5,16E+06
45,5	4,14E+07	1,02E+06	4,90E+06
69	4,73E+07	1,16E+06	6,17E+06
93,5	6,20E+07	9,10E+05	9,90E+06
117,5	4,47E+07	7,74E+05	1,13E+07
145	4,13E+07	8,42E+05	1,87E+07

Tabela 8 – Experimento 2 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Glutamina (mmol)	Arginina (mmol)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
7	3,17	1,59	0,66	3,09	0,26
25	2,86	1,35		4,49	
45,5	2,46	1,17	0,54	6,37	0,62
69	1,97	0,89	0,60	9,11	
93,5	1,25	0,51		11,90	2,17
117,5	0,71	0,34		14,00	
145	0,00	0,18	0,04	17,10	4,06

Tabela 9 – Experimento 2 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO₂ da atmosfera do meio de cultivo

Tempo (h)	CO ₂ (%)	pH	Agitação	
			rpm	ângulo
7	5,0	7,35	2	2
25	5,0	7,36	2	2
45,5	5,0	7,32	5	2
69	3,0	7,27	5	4
93,5	2,0	7,11	5	5
117,5	4,5	7,38	6	5
145	4,5	7,26	6	5

Experimento 3**Tabela 10 – Experimento 3 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.**

Tempo (h)	Número de células aderidas	Desvio Padrão	Número de células em suspensão
4	2,19E+07	2,50E+05	8,20E+06
8,5	1,71E+07	1,50E+05	4,39E+06
25	3,53E+07	1,60E+05	2,04E+06
45,5	3,05E+07	7,23E+05	6,58E+06
69,5	3,37E+07	1,30E+05	6,02E+06
93,5	5,22E+07	1,50E+05	7,14E+06
118	3,24E+07	8,04E+05	6,24E+06

Tabela 11 – Experimento 3 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Glutamina (mmol)	Arginina (mmol)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
4	3,16	1,84	0,61	2,46	
8,5	3,10	1,80		2,53	0,20
25	2,83	1,53		2,98	
45,5	2,58	1,20	0,51	3,62	0,60
69,5	2,22	1,05		5,27	
93,5	2,06	1,05	0,47	6,49	1,23
118	1,66	0,93	0,29	8,84	1,91

Tabela 12 – Experimento 3 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO₂ da atmosfera do meio de cultivo

Tempo (h)	CO ₂ (%)	pH	Agitação	
			rpm	ângulo
4	5,0	7,30	4	2
8,5	4,5	7,37	5	2
25	4,5	7,42	7	4
45,5	5,0	7,39	7	4
69,5	5,0	7,27	10	4
93,5	5,0	7,30	10	4
118	5,0	7,17	10	4

Experimento 4

Tabela 13 – Experimento 4 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Desvio Padrão	Número de células em suspensão
4	1,88E+07	1,54E+05	5,25E+06
7,5	2,92E+07	5,19E+05	3,65E+06
24,75	1,96E+07	2,71E+05	2,13E+06
46	5,24E+07	8,19E+05	3,80E+06
70	4,32E+07	4,85E+05	3,37E+06
93,5	6,39E+07	1,52E+06	5,26E+06
117,5	4,85E+07	8,58E+05	5,96E+06
141,5	3,77E+07	5,85E+05	7,81E+06

Tabela 14 – Experimento 4 - Dados de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Glutamina (mmol)	Arginina (mmol)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
4	3,09	1,92	0,70	1,82	
7,5	3,04	1,86		1,99	0,20
24,75	2,76	1,48	0,50	2,38	
46	2,52	1,20		2,86	0,64
70	2,07	1,00		3,45	
93,5	1,66	0,93	0,36	4,36	1,32
117,5	1,50	0,95		4,83	1,60
141,5	1,39	1,01	0,13	5,42	1,91

Tabela 15 – Experimento 4 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO₂ da atmosfera do meio de cultivo

Tempo (h)	CO ₂ (%)	pH	Agitação		Sistema de Vibração
			rpm	ângulo	
4	5,0	7,38	5	2	desligado
7,5	5,5	7,38	5	2	desligado
24,75	5,6	7,34	5	5	5 s a cada 4 min
46	5,8	7,31	7	5	5 s a cada 10 min
70	5,5	7,23	8	5	5 s a cada 10 min
93,5	4,8	7,15	9	5	5 s a cada 10 min
117,5	4,0	7,08	9	5	5 s a cada 10 min
141,5	2,0	7,11	9	5	5 s a cada 10 min

Experimento 5**Tabela 16 – Experimento 5 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.**

Tempo (h)	Número de células aderidas	Desvio Padrão	Número de células em suspensão
8	2,48E+07	4,14E+05	1,50E+06
24	4,91E+07	1,31E+06	2,95E+06
46,5	9,28E+07	3,16E+06	4,32E+06
71,5	1,00E+08	1,85E+06	2,47E+06
94,5	1,02E+08	1,55E+06	5,27E+06
118,5	4,86E+07	6,69E+05	6,79E+06
146	5,22E+07	1,54E+06	6,24E+06
168	3,80E+07	8,45E+05	7,04E+06

Tabela 17 – Experimento 5 - Dados de glicose, arginina, lactato e amônia.

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Arginina (mmol)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
0				
8	3,95	0,54	1,64	0,25
24	3,60		1,99	0,32
46,5		0,67		0,46
71,5	2,34		3,35	0,59
94,5		0,75		0,80
118,5	4,13		5,03	0,88
146		0,75		1,79
167	4,69		5,86	2,11

Tabela 18 – Experimento 5 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO₂ da atmosfera do meio de cultivo

Tempo (h)	CO ₂ (%)	pH	Agitação	
			rpm	ângulo
0				
8	10,0	7,28	2	2
24	10,0	7,19	5	5
46,5	8,2	7,20	5	5
71,5	7,6	7,15	5	5
94,5	7,0	7,14	5	5
118,5	7,5	7,07	10	6
146	6,5	7,06	15	6
167	7,0	7,07	15	6

Experimento 6

Tabela 19 – Experimento 6 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Desvio Padrão	Número de células em suspensão
0,0			
8,8	2,30E+07	3,50E+05	2,10E+07
24,7	3,54E+07	9,20E+05	4,06E+06
46,0	2,74E+07	7,55E+05	2,42E+06
70,0	2,42E+07	3,39E+05	2,85E+06
95,0	3,03E+07	7,98E+05	8,28E+06
119,0	2,07E+07	2,45E+05	9,87E+06

Tabela 20 – Experimento 6 - Dados de glicose, arginina, lactato e amônia.

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Arginina (mmol)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
0,0				
8,8		0,57		0,24
24,7	2,78	0,52	1,86	0,36
46,0	3,21	0,71	2,69	0,69
70,0	2,60	0,47	3,42	1,36
95,0			5,04	1,75
119,0	2,84		5,82	2,18

Tabela 21 – Experimento 6 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO₂ da atmosfera do meio de cultivo

Tempo (h)	CO ₂ (%)	pH	Agitação	
			rpm	ângulo
0,0	9,0	7,28	2	2
8,8	9,0	7,21	2	2
24,7	8,0	7,29	5	2
46,0	8,5	7,12	10	4
70,0	7,0	7,12	14	8
95,0	6,5	7,01	14	8
119,0	5,5	6,87	14	8

Experimento 7

Tabela 22 – Experimento 7 - Número de células aderidas aos microcarregadores e células em suspensão.

Tempo (h)	Número de células aderidas	Desvio Padrão	Número de células em suspensão
0,0			3,00E+07
8,5	2,55E+07	3,87E+05	4,50E+06
24,0	6,47E+07	1,61E+05	4,76E+06
46,7	4,19E+07	7,95E+05	9,29E+06
70,7	4,40E+07	2,96E+05	8,29E+06
94,0	4,96E+07	3,51E+05	8,78E+06
118,3	5,94E+07	1,42E+05	9,57E+06
142,0	5,03E+07	8,89E+05	8,25E+06
166,0	3,94E+07	2,86E+05	6,72E+06

Tabela 23 – Experimento 7 - Dados de glicose, arginina, lactato e amônia.

Tempo (h)	Glicose (mmol)	Arginina (mmol)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
0	4,66		1,13	0,17
8,5	4,53	0,78	1,20	0,38
24	5,09	0,68	1,52	0,65
46,67	4,92	0,74	1,82	1,39
70,67	4,05	0,55	2,08	2,21
94	3,43	0,26	2,57	2,86
142	2,92		6,37	
166	3,26		6,39	

Tabela 24 – Experimento 7 - Dados de velocidade e ângulo de agitação da plataforma, pH e porcentagem de CO₂ da atmosfera do meio de cultivo

Tempo (h)	CO ₂ (%)	pH	Agitação	
			rpm	ângulo
0	10,0	7,34	2	2
8,5	10,0	7,27	2	2
24	8,5	7,20	5	5
46,67	7,5	7,21	12	7
70,67	7,5	7,09	14	8
94	5,5	7,09	14	8
118,33	2,5	7,13	14	8
142	1,5	7,17	14	8
166	3,0	7,06	14	8

Apêndice 3. Tabelas com as concentrações de aminoácidos para os experimentos realizados.

Experimento 1

Tabela 25 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 1.

Aminoácido	Concentração (mM)			
	48 h	96 h	144 h	192 h
asp	0,162	0,188	0,214	0,182
glu	0,724	1,017	1,198	0,960
asn	0,292	0,282	0,162	0,269
ser	0,151	0,141	0,332	0,136
gln	2,265	1,887	2,013	1,670
gli	0,739	0,692	0,948	0,815
his	0,158	0,163	0,203	0,179
arg	2,275	0,067	0,057	0,067
thr	0,290	0,186	0,200	0,192
ala	0,589	0,687	0,857	0,795
pro	0,395	0,404	0,481	0,450
tyr	0,226	0,214	0,222	0,183
val	0,476	0,416	0,458	0,389
met	0,068	0,066	0,111	0,061
cis	0,129	0,102	0,074	0,059
ile	0,396	0,475	0,484	0,436
leu	0,401	0,376	0,417	0,367
phe	0,219	0,222	0,258	0,224
lis	0,413	0,392	0,441	0,380

Experimento 2**Tabela 26 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 2.**

Aminoácido	Concentração (mM)				
	8 h	48 h	72 h	144 h	168 h
asp	0,100	0,120	0,178	0,005	0,238
glu	0,298	0,605	1,211	2,723	2,381
asn	0,149	0,142	0,320	0,315	0,308
ser	0,286	0,259	0,157	0,147	0,151
gln	2,317	1,955	1,905	0,174	0,160
gli	0,639	0,719	0,862	1,106	1,122
his	0,150	0,154	0,198	0,242	0,228
arg	2,277	2,070	2,420	0,178	0,064
thr	0,263	0,249	0,252	0,409	0,215
ala	0,412	0,524	0,802	1,224	1,538
pro	0,326	0,358	0,491	0,760	0,678
tyr	0,172	0,186	0,225	0,290	0,263
val	0,402	0,432	0,506	0,520	0,545
met	0,061	0,069	0,075	0,094	0,089
cis	0,091	0,093	0,096	0,068	0,055
ile	0,334	0,348	0,443	0,552	0,605
leu	0,348	0,349	0,418	0,482	0,502
phe	0,183	0,192	0,255	0,334	0,359
lis	0,330	0,331	0,448	0,182	0,460

Experimento 3**Tabela 27 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 3.**

Aminoácido	Concentração (mM)		
	48 h	96 h	120 h
asp	0,116	0,150	0,144
glu	0,686	0,976	1,109
asn	0,146	0,172	0,325
ser	0,245	0,333	0,168
gln	1,790	2,010	1,779
gli	0,745	0,832	0,891
his	0,150	0,231	0,218
arg	2,051	1,978	1,313
thr	0,226	0,182	0,233
ala	0,504	0,769	0,836
pro	0,346	0,459	0,488
tyr	0,178	0,223	0,246
val	0,394	0,494	0,509
met	0,060	0,075	0,077
cis	0,080	0,079	0,082
ile	0,332	0,448	0,494
leu	0,353	0,431	0,449
phe	0,184	0,243	0,260
lis	0,334	0,414	0,456

Experimento 4**Tabela 28 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 4.**

Aminoácido	Concentração (mM)			
	4 h	48 h	96 h	144 h
asp	0,109	0,111	0,133	0,151
glu	0,363	0,705	0,964	1,14
asn	0,250	0,220	0,180	0,21
ser	0,260	0,224	0,251	0,237
gln	2,399	1,351	1,422	1,329
gli	0,748	0,652	0,715	0,733
his	0,159	0,153	0,149	0,159
arg	2,345	1,776	1,370	0,422
thr	0,253	0,177	0,179	0,165
ala	0,450	0,517	0,658	0,747
pro	0,348	0,329	0,383	0,405
tyr	0,177	0,155	0,188	0,185
val	0,395	0,344	0,362	0,351
met	0,064	0,054	0,063	0,065
cis	0,095	0,068	0,061	0,057
ile	0,342	0,305	0,371	0,441
leu	0,367	0,310	0,350	0,356
phe	0,176	0,170	0,200	0,201
lis	0,363	0,331	0,383	0,359

Experimento 5**Tabela 29 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 5.**

Aminoácido	Concentração (mM)		
	48 h	96 h	144 h
asp	0,122	0,167	0,227
glu	0,545	0,732	1,393
asn	0,175	0,148	0,125
ser	0,286	0,310	0,419
gln	2,308	2,565	2,383
gli	0,812	0,895	1,092
his	0,177	0,198	0,252
arg	2,336	2,475	2,405
thr	0,258	0,243	0,276
ala	0,518	0,657	0,873
pro	0,383	0,464	0,591
tyr	0,194	0,223	0,257
val	0,405	0,468	0,513
met	0,069	0,075	0,093
cis	0,116	0,128	0,168
ile	0,353	0,421	0,557
leu	0,364	0,410	0,524
phe	0,197	0,224	0,294
lis	0,394	0,412	0,507

Experimento 6**Tabela 30 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 6.**

Aminoácido	Concentração (mM)			
	8 h	24 h	46 h	72 h
asp	0,135	0,114	0,146	0,128
glu	0,354	0,424	0,779	1,029
asn	0,224	0,258	0,261	0,216
ser	0,209	0,227	0,275	0,230
gln	3,236	3,107	3,605	2,641
gli	0,677	0,613	0,732	0,599
his	0,187	0,205	0,240	0,234
arg	2,287	2,153	2,503	1,714
thr	0,281	0,287	0,324	0,197
ala	0,483	0,478	0,664	0,727
pro	0,371	0,382	0,473	0,443
tyr	0,173	0,171	0,207	0,182
val	0,341	0,332	0,406	0,360
met	0,085	0,082	0,102	0,090
cis	0,100	0,099	0,128	0,094
ile	0,311	0,308	0,365	0,342
leu	0,363	0,352	0,428	0,379
phe	0,209	0,209	0,240	0,227
lis	0,368	0,375	0,428	0,409

Experimento 7**Tabela 31 – Concentrações de aminoácidos para o Experimento 7.**

Aminoácido	Concentração (mM)				
	8 h	24 h	48 h	96 h	142 h
asp	0,110	0,098	0,110	0,129	0,128
glu	0,366	0,473	0,741	1,144	1,408
asn	0,238	0,264	0,301	0,246	0,215
ser	0,252	0,249	0,250	0,220	0,227
gln	3,663	3,043	3,198	2,555	2,103
gli	0,882	0,838	0,641	0,643	0,581
his	0,214	0,217	0,240	0,268	0,277
arg	2,589	2,309	2,373	1,869	0,963
thr	0,308	0,297	0,253	0,187	0,151
ala	0,532	0,528	0,648	0,848	0,966
pro	0,420	0,408	0,444	0,500	0,504
tyr	0,190	0,177	0,187	0,203	0,201
val	0,385	0,356	0,382	0,399	0,402
met	0,098	0,091	0,097	0,104	0,108
cis	0,111	0,097	0,103	0,082	0,057
ile	0,353	0,324	0,348	0,392	0,421
leu	0,398	0,381	0,397	0,424	0,440
phe	0,226	0,214	0,223	0,250	0,260
lis	0,375	0,410	0,410	0,439	0,452