

tema robusto que permita um maior rendimento celular em menor período de tempo e, consequentemente, minimizar os efeitos deletérios do cultivo celular prolongado, mantendo os atributos celulares das hADSC. Para tanto, foram conduzidos experimentos em cultura estática e de suspensão em escala ampliada (frasco spinner de 125 mL) ou larga escala (biorreator de 1L). Os resultados não mostraram diferença ($p < 0,05$) quanto à influência do volume de meio de cultura (5, 10 ou 15 mL) sobre o rendimento celular em cultura estática. No desenvolvimento de um protocolo de cultivo em frasco spinner os resultados permitiram definir a concentração celular inicial de 30 células/microcarregador (30:1) equivalente a $2,4 \times 10^4$ células/mL, regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, meio de cultura com 10% de SFB e renovação de 50% a cada 72 h, empregando-se o microcarregador gelatinoso macroporoso Cultispher-S em 1g/L e velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa. A seguir foi otimizado o cultivo em larga escala em biorreator por meio de uma avaliação gradual de cada variável do bioprocessamento, definindo-se como a melhor condição de cultivo: concentração celular inicial de $1,2 \times 10^4$ células/mL, regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, meio de cultura com 10% de SFB e 25% de renovação a cada 48h, velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa, microcarregador gelatinoso macroporoso Cultispher-S em 1g/L e concentração de oxigênio dissolvido de 20% a 40% (ajustes a cada 72h). O cultivo celular em biorreator também foi avaliado quanto à integridade genômica por meio do ensaio cometa que demonstrou uma fragmentação progressiva do DNA em função do tempo das células em cultivo e do teste do micronúcleo que não diferenciou na frequência de células micronucleadas comparativamente a situação pré-cultivo em biorreator. Os resultados obtidos permitem concluir que a adequação de diferentes parâmetros das condições de cultivo de hADSC em biorreator aumenta o rendimento do processo em menor tempo de cultivo, minimizando os efeitos de instabilidade genética e mantendo a viabilidade celular. Deve-se enfatizar, como proposição deste estudo, a necessidade de incorporar os testes de análise de integridade do material genético e de viabilidade nos processos de proliferação celular em biorreator.

Palavras-chave: Células-tronco; Tecido adiposo; Biorreator; Proliferação; Frasco spinner; Genotoxicidade.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.704>

703

HYPOXIA AND 3D COMBINED PRIMING IMPROVES IN VITRO PARACRINE ANGIOGENIC POTENTIAL OF UC-MSC

N.C. Noronha^{a,b}, A. Mizukami^b, M.D. Orellana^b, D.T. Covas^{b,c}, K. Swiech^{b,d}, K.C.R. Malmegrim^{b,e}

^a Programa de Biociências e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Centro de Terapia Celular (CTC), Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Background: Mesenchymal Stromal Cells (MSC) possess diverse immunomodulatory and regenerative properties, and play an essential role in tissue homeostasis, surveillance and repair, mainly mediated via paracrine signaling. MSC have been largely studied regarding therapeutic potential for a variety of immunological and degenerative diseases. Clinical applications of MSC-based therapy require scalable expansion process and Good Manufacturing Practice (GMP) compliant production. Inconsistency of the therapeutic potential and low survival of transplanted cells require search for priming/preconditioning strategies and new approaches GMP-compliant expansion to produce robust and functional MSC products. **Aim:** Establishment of a GMP and scalable bioprocess for hypoxia-primed UC-MSC expansion and analysis of in vitro paracrine potential of primed cells. **Methods:** MSC from umbilical cord (UC-MSC) were expanded for 5 days under xenoantigen-free conditions primed with hypoxia (oxygen concentration of 5%) in a three-dimensional culture using microcarriers and stirred-tank bioreactor system. Harvested cells were characterized by immunophenotyping and differentiation potential. The paracrine angiogenic potential of expanded/primed UC-MSC upon human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was evaluated by the capillary-like structure assay performed in Matrigel-Growth Factor Reduced Membrane and scratch/gap closure assay, using conditioned medium (CM) from stirred cultures. **Results:** UC-MSC exhibited efficient and similar expansion in stirred system under both conditions $1.69 (\pm 0.29) \times 10^5$ cells/mL in hypoxic and $1.74 (\pm 0.23) \times 10^5$ cells/mL in normoxic culture, a fold increase of 6.98 (± 1.08) and 7.46 (± 2.0), respectively. Cells retained their immunophenotype and differentiation ability. CM from hypoxia primed-MSC promoted higher HUVEC migration rates compared to normoxic cultures 64.9% (± 0.04) vs. 45.7% (± 0.08), and higher formation of capillary-like structures in Matrigel. **Conclusions:** These results represent an important step toward the establishment of a GMP-compliant large-scale production system for functional hypoxia primed UC-MSC, and confirm higher angiogenic capacity of these cells in vitro. New experiments are needed to evaluate the effect of priming with hypoxia to immunomodulatory and angiogenic in vivo potential.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.705>

