

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

ERIC TAKASHI KATAYAMA

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE CÉLULAS
TUMORAIS EM FORMA DE AGREGADOS EM BIORREATOR DE VÓRTICES DE
TAYLOR**

SÃO CARLOS

2017

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE CÉLULAS
TUMORAIS EM FORMA DE AGREGADOS EM BIORREATOR DE VÓRTICES DE
TAYLOR**

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

ERIC TAKASHI KATAYAMA

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE CÉLULAS
TUMORAIS EM FORMA DE AGREGADOS EM BIORREATOR DE VÓRTICES DE
TAYLOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química para obtenção do título de mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Pesquisa e desenvolvimento De Processos químicos.
Orientação: Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

SÃO CARLOS

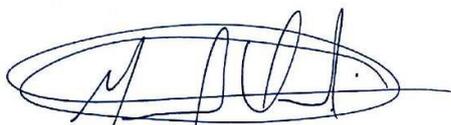
2017

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ERIC TAKASHI KATAYAMA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 24 DE FEVEREIRO DE 2017.

BANCA EXAMINADORA:


Cláudio-Alberto Torres Suazo
Orientador, UFSCar


Kamilla Swiech Antonietto
USP


Marcel Otávio Cerri
UNESP

“As pessoas não são lembradas pelo número de vezes que fracassam, mas sim pelo número de vezes que têm sucesso”.

(Thomas Alva Edison)

AGRADECIMENTOS

À toda minha família: meu pai Makoto, minha mãe Marilena, minha irmã Katia pelo apoio e compreensão e pelo apoio em todos os desafios enfrentados e em todas as tomadas de decisões.

Ao professor Claudio pela orientação e por ter acreditado na minha adaptação a vida acadêmica.

Aos amigos do laboratório, Ana Carolina, Juliana, Marcelo, Monize, Rebeca que tiveram a paciência de me treinar para as técnicas de laboratório, em especial ao Diogo com as células RT 4 e a Viviane com o biorreator de vórtices.

Aos amigos da pós-graduação com os quais compartilhei boas lembranças durante o primeiro semestre. Dentre eles, Alice, Camila, Catarina, José Roberto, Kaio, Nayana, Tiago e Vanessa.

À Ana Luisa da pós-graduação da USP de São Carlos por compartilhar os conhecimentos relacionados a estatística e planejamento.

Ao Gilson pela ajuda na modelagem de equações.

Ao técnico Amadeus pela ajuda na finalização do trabalho.

Ao professor Marcel da UNESP de Araraquara e a professora Kamilla da USP de Ribeirão Preto pelas participações no exame de qualificação e na defesa da dissertação. Agradeço também pelas sugestões para o melhoramento do trabalho e pela compreensão em relação aos problemas.

Ao CNPQ pela bolsa de estudo concedida.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

RESUMO

O cultivo de células animais vem ganhando grande interesse em várias aplicações biotecnológicas. O cultivo de células de câncer em particular tem sido utilizado para testes de drogas anticancerígenas. O grande obstáculo enfrentado na atualidade é que das drogas que apresentam uma boa eficácia nas células cultivadas, poucas apresentam o mesmo resultado em testes clínicos. Drogas antitumorais são testadas em células que são cultivadas em duas dimensões (2D), enquanto que células tumorais em organismos crescem em três dimensões (3D). Por este motivo há a necessidade de estabelecer uma metodologia para cultivo de células em 3D, como em modelo de esferoides, pois nestes, as células mimetizam melhor os tumores *in vivo*. Diversas metodologias para produção de esferoides estão sendo pesquisadas, e o modelo dinâmico, que geralmente é utilizado em biorreatores, apresenta a vantagem de produzir uma grande quantidade de esferoides. Um grande inconveniente do uso de biorreatores é que a agitação do fluido necessária para manter o ambiente homogêneo pode ser letal para as células. Para contornar este problema, diferentes tipos de biorreatores têm sido pesquisados, sendo o biorreator de vórtices de Taylor, caracterizados por gerar baixas tensões de cisalhamento. Como recurso coadjuvante para diminuir a morte celular e melhorar a agregação celular pode-se aumentar a viscosidade do meio de cultura mediante o uso de um aditivo inerte como dextrana. O objetivo deste trabalho é o de identificar fatores importantes para diminuir os efeitos letais da agitação e facilitar a formação de esferoides utilizando um biorreator de Taylor e incrementar a viscosidade do meio com o uso de dextrana. Utilizando um biorreator de Taylor de 100 mL de capacidade foram feitos oito cultivos da linhagem tumoral RT4 de câncer de bexiga utilizando duas metodologias de agitação. Para cada metodologia de agitação utilizou-se, quatro cultivos em dois níveis de agitação e dois níveis de viscosidade em meio McCoy's a 37 °C e pH em torno de 7,20. Em todos esses cultivos foram possíveis obter esferoides, no entanto o cultivo a 90 rpm, 0,80 cp e método de agitação intermitente, foi o único cultivo no qual obteve-se esferoides com um diâmetro médio na faixa de 300 a 400 μm , houve pouco esferoides produzidos. Na maioria dos cultivos obtiveram-se esferoides na faixa de 100 a 200 μm e com valores de esfericidade próxima de 0,80. No geral, os cultivos com maior viscosidade forneceram resultado melhores de agregação. Foi possível utilizar o modelo de agregação de Smoluchowski para representar a cinética de formação de agregados das células RT4 cultivadas no BVT.

Palavras-chave: Células tumorais; câncer; RT4; cultivo 3D; agregados; esferoides celulares; biorreator de vórtices de Taylor; tensão de cisalhamento.

ABSTRACT

Cultivation of animal cell is gaining great interest in various biotechnological applications. The growth of cancer cells in particular has been used for cancer-fighting drugs tests. The major obstacle faced in the present is that of the drugs that have a good effectiveness in cultured cells, few have the same result in clinical trials. Antitumor drugs are tested in cells that are grown in two dimensions (2D), whereas tumor cells in organisms grow in three dimensions (3D). For this reason, there is a need to establish a methodology for cultivation of cells in 3D, like in spheroids model, because in these cells mimic the tumors *in vivo*. Several methodologies for production of spheroids are being searched, and the dynamic model, which is usually held in bioreactors, presents the advantage of producing a large amount of spheroids. A big drawback of using bioreactors is the agitation required to maintain homogeneous environment can be lethal to cells. To work around this problem, different types of bioreactors have been researched, and the Taylor vortices bioreactor, characterized by low shear stresses generate. As a supporting feature to reduce cell death to improve cellular aggregation, the viscosity of the culture can be increase by the use of inert additives such as dextran. The aim of this work is to identify important factors to reduce the lethal effects of agitation and facilitate the formation of spheroids using a bioreactor of Taylor and increase the viscosity of the medium with dextran use. Using a bioreactor of Taylor of 100 mL were made eight experiments of tumor RT4 lineage of bladder cancer using two methods of agitation. For each agitation methodology, four cultures were used at two stirring levels and two viscosity levels in McCoy's medium at 37 °c and pH around 7.20. In all these cultures, it was possible to obtain spheroids, however the culture of 90 rpm, 0,80 cp and intermittent agitation was the only in which was obtained spheroids with a mean diameter in the range of 300 to 400 µm were obtained, there were few spheroids produced. In most cultures spheroids were obtained in the range of 100 to 200 µm and with circularity values close to 0.80. In general, crops with higher viscosity provided better aggregation results. It was possible to use the aggregation model of Smoluchowski to show the aggregation formation kinetic from RT4 cells in the BVT .

Key words: tumor cells; cancer; Rt4; 3D cultivation; aggregates; esferoides;; Taylor vortices bioreactor; shear stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da distribuição estimada padronizada por uma taxa de índice de incidência por idade sobre 100.000, para câncer de bexiga em homens em 2012.	25
Figura 2 – Mapa da distribuição estimada padronizada por uma taxa de índice de incidência por idade sobre 100.000, para câncer de bexiga em mulheres em 2012.	25
Figura 3 – Estimativa numérica de 2012 global de novos casos e óbitos para câncer de bexiga de ambos os sexos.	26
Figura 4 - Frascos T. Frascos utilizados para cultivar células em monocamadas (2D).....	27
Figura 5 – Modelo de cultivo de células em 2D quando há apenas um tipo de células (monocultura) e quando há mais de um tipo células (co-cultura).	28
Figura 6 – Desenho esquemático do esferoide e seu mecanismo de formação. (A) Esferoide multicelular, a organização concêntrica de células proliferativas e necróticas. (B) Formação dos esferoides baseada em aglomeração por agrupamento (cultivo estático) e aglomeração baseado em colisão (cultivo dinâmico). (C) Padrão de aglomeramento que ocorre é referido como auto-organização.	30
Figura 7 – Utilização de força centrífuga para forçar as a acumulação e agregação delas no fundo de um tubo cônico.	35
Figura 8 – Desenho esquemático da formação de esferoide por gota pendente.	36
Figura 9 – As células se aglomeram entre elas devido ao fato de estarem sobre uma superfície não-adesiva.	36
Figura 10 – Desenho esquemático da formação de esferoides por camadas celulares com auxílio de um polímero que muda suas características.....	37
Figura 11 – As células fluem por uma rede de micro-canais e quando chegam nas micro-câmaras, as células são expostas a um fluido micro-rotacional o que causa a colisão célula-células e a formação de esferoides.	37
Figura 12 – Desenho esquemático da formação de esferoides utilizando micromoldes de hidrogéis não adesivo.	38
Figura 13 – Formação de esferoide em um cultivo dinâmico. Os esferoides se formam devido a colisão célula-célula devido a movimentação do fluido.	39
Figura 14 – Classificação dos dispositivos dos biorreatores para cultivo.	40
Figura 15 – Foto do biorreator tipo spinner.....	41
Figura 16 – Interação entre o fluido do biorreator com os aglomerados (ou microcarregadores). (a) Células isoladas ou aglomerados (ou microcarregadores) pequenos são capturados por turbilhões maiores que eles e segue o movimento do fluido. (b) Quando diversos turbilhões com	

sentidos de rotação opostos interagem com aglomerados maiores que os turbilhões aumenta a tensão de cisalhamento na superfície da partícula.....	45
Figura 17 – Esquema do biorreator (MASSAI et al., 2016). (A) Representação esquemática da câmara de cultura do biorreator, indicando os componentes internos e sua simetria axial (linhas vermelhas). (B) Foto do biorreator. (C) Representação esquemática do biorreator ligado ao circuito de circulação. O biorreator e o reservatório do meio são posicionados dentro da incubadora.	47
Figura 18 – Campo de escoamento dentro do biorreator visualizado entre a interação mutual entre o meio e as células a em uma condição de baixa tensão de cisalhamento. A representação do campo de escoamento utilizando linhas de convolução integral linear é representado por A e a representação simplificada clássica por A1. As setas amarelas indicam a entrada e saída do fluxo, seta azul indica os “vórtices flutuantes primários” e as setas vermelhas as setas “vórtices flutuantes secundárias”	48
Figura 19 – Fração volumétrica ocupadas pelas células suspensas dentro da câmara de cultura em diferentes tempos. Observa-se que no início (0 min) as células estão em uma fração de 0,33. Assim que o processo é iniciado, o meio começa a circular no biorreator. Após 5 minutos as células ficam suspensas em uma fração volumétrica de 0,33%.	49
Figura 20 – Modelo do RWV. Este biorreator é composto de dois cilindros concêntricos e o cilindro externo gira, funcionando como um agitador. O movimento de rotação auxilia na aglomeração celular. A ausência de impelidores evita a colisão de células com este componente do biorreator e evita altos picos de tensão de cisalhamento	50
Figura 21 – Geometria do BVT. Para que os vórtices se formem, é necessário que o cilindro interno de raio r_i rotacione.....	52
Figura 22 – Diferentes tipos de regime no BVT. Onde a) representa o regime laminar; b) o regime dos vórtices de Taylor onde pares de vórtices são formados sendo que cada um rotaciona em um sentido diferente; c) o regime wavy também forma pares de vórtices onde cada um gira em um sentido diferente; d) o regime turbulento	55
Figura 23 - Estrutura do vórtice de Taylor a um $Ta = 141,9$ (157,63 rpm), regime wavy, para um biorreator com $\Gamma=35$. Em (A) é possível notar que a velocidade do meio é maior perto do cilindro interno, o cilindro que se movimenta. Em (B) ilustra que a velocidade no centro do vórtice é baixa, e nas suas extremidades são onde ocorrem as maiores velocidades. Em (C) mostra que são poucas as regiões onde a tensão de cisalhamento é próxima de 1 Pa. (velocidade e tensão de cisalhamento na região anular)	56

Figura 24 – Velocidade de lise celular em função da tensão de cisalhamento. Apresenta a velocidade de lise celular em função da tensão de cisalhamento nas células SF-9. O meio sem dextrana é representado por ■; meio com 0,5% de dextrana representado por ●; meio com 4,5% de dextrana representado por □.	60
Figura 25 – Efeito da dextrana no crescimento da linhagem FS 4. O excesso de dextrana pode interferir na velocidade decrescimento das células.	61
Figura 26 – Taxa de morte específica das células BEK de acordo com a viscosidade do meio em um biorreator spinner a diferentes níveis de agitação. (x) 100 rpm; (o) 120 rpm; (+) 140 rmp;(□) 150 rpm; (Δ) 160 rpm.	62
Figura 27 – Velocidade de crescimento celular das células BEK em um biorreator spinner de acordo com o nível de agitação e a viscosidade do meio. (Δ) Cultura estática em placas de petri; (x) 45 rpm; (o) 90 rpm; (●) 120 rpm; (▲)140 rpm; (□) 160 rpm.	63
Figura 28 – Biorreator de vórtices de Taylor utilizados nos experimentos de cultivo neste trabalho	68
Figura 29 – Detalhamento do cilindro interno de Teflon do BVT, com a) a face inferior com quatro imãs, b) a face superior com quatros furos para saída gases, c) o perfil lateral do cilindro e em d) o mesmo perfil lateral com a membrana de silicone e a tampa do biorreator.	70
Figura 30 – Esquema do biorreator Couette-Taylor e seus componentes principais e o processo de funcionamento.	71
Figura 31 – Procedimento seguido para realização do cultivo para a formação de agregados das células RT4.	73
Figura 32 – Procedimento de diluição da dextrana para se obter no final uma viscosidade de 1,65 cP. (a) Biorreator vazio onde era adicionado o meio com dextrana concentrada acima do nível desejado. (b) Biorreator com meio com dextrana na concentração de 39,5 mg/mL prestes a ser inoculado com células e meio isentos de dextrana. (c) Biorreator com células e meio com dextrana na concentração desejada de 27,4 mg/mL e viscosidade de 1,65 cP.	75
Figura 33 – Análise da partícula por contraste utilizando o software ImageJ 1.51. A área vermelha seria a região que o programa utilizara para fazer as medições. O contraste pode ser ajustável, ou seja, pode-se selecionar área de toda partícula desde que o contraste esteja adequado.	78
Figura 34 – Aglomeração de esferoides para a formação de um esferoide maior. O tempo em que isso que essa aglomeração começa a ocorrer pode variar de acordo com a condição de cultivo.	84

Figura 35 – Aglomeração das células e crescimento dos esferoides dentro do biorreator com agitação contínua (cont; 90; 1,65).	84
Figura 36 – Típica junção de dois grandes esferoides durante o cultivo das células RT4 no biorreator de Taylor.....	85
Figura 37 – Esferoides que sedimentaram e permaneceram segregados no fundo do biorreator de Taylor devido ao seu grande tamanho.	85
Figura 38 – Comportamento do pH durante os cultivos de agregação das células RT4 no BVT.	87
Figura 39 – Resultados de concentração das células RT4 livres em função do tempo nos experimentos de cultivo no BVT.....	88
Figura 40 – Resultados de medida do diâmetro médio dos agregados durante os cultivos da linhagem RT4 no BVT em função do tempo.	89
Figura 41 – Resultados das medidas de esfericidade dos agregados obtidos nos cultivos da célula RT4 no BVT.....	91
Figura 42 – Resultados de concentração de esferoides nos cultivos de célula RT4 em função do tempo. Foi considerado que os esferoides eram formados a partir das 20 horas.....	92
Figura 43 – Comportamento da cinética de agregação das células RT4 nos experimentos de cultivo no BVT. As retas representam a regressão linear dos dados experimentais de número de agregados totais T em função do tempo t. O valor inicial de N_T foi prefixado já que o inóculo foi igual para todos os cultivos.	94
Figura 44 - Comportamento fração volumétrica das células RT4 nos experimentos de cultivo no BVT.	96
Figura 45 – Histograma da distribuição de diâmetro dos esferoides em diferentes condições de cultivo da célula RT4 no BVT do método de agitação intermitente.	101
Figura 46 - Histograma da distribuição de diâmetro dos esferoides em diferentes condições de cultivo da célula RT4 no BVT do método de agitação contínua.	102
Figura 47 – Resultados das análises de concentração de glicose, lactato, glutamina e cisteína nos cultivos com a célula RT4 no BVT a metodologia de agitação intermitente.....	104
Figura 48 – Resultado das análises de concentração de glicose, lactato, glutamina e cisteína nos cultivos com a célula RT4 no BVT com a metodologia de agitação contínua.	105
Figura 49 – Curva característica da variação da viscosidade em função da concentração de dextrana. A solução se trata do meio de cultura utilizada em experimento.	124
Figura 50 – Concentração de aminoácidos em cultivos de agitação intermitente.....	125
Figura 51 – Concentração de aminoácidos com cultivos de agitação contínua.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais diferenças nas características das células em processos de cultura 2D e 3D.	34
Tabela 2 – Esferoides de linhagens obtidos em biorreator spinner.	42
Tabela 3 – Efeito do volume de meio no crescimento de células de hibridomas em um biorreator de 2 L.	46
Tabela 4 – Dimensões do BVT utilizado por CURRAN; BLACK, 2004.	53
Tabela 5 – Valores de $Ta_{crit,wavy}$ em diferentes geometrias de biorreatores.	54
Tabela 6 - Valores de $Ta_{crit,turb}$ em diferentes geometrias de biorreatores.	54
Tabela 7 – Composição do meio de cultura McCoy's 5A utilizado nos cultivos da linhagem RT4 para a preparação de 1 litro de meio.	66
Tabela 8 – Dimensões características do biorreator de vórtices de Taylor.	69
Tabela 9 – Valores do parâmetro, fator de correção e número crítico de Taylor para o biorreator utilizado nos experimentos.	71
Tabela 10 – Valores de Ta para todas as condições de cultivo utilizada.	72
Tabela 11 – Composição de 1L da solução PBS utilizada para a retirada de células mortas e excesso de meio no frasco T.	74
Tabela 12 – Exemplo de tabela de variáveis independentes e variáveis respostas.	80
Tabela 13 – Numeração dos cultivos e condições de operação.	82
Tabela 14 – Verificação das velocidades de crescimento das células para diferentes concentrações de dextrana.	83
Tabela 15 – Valores das constantes de agregação k_{ag} R^2 dos cultivos realizados com a célula RT4 no BVT.	95
Tabela 16 – Principais efeitos causados pela velocidade de rotação e pela viscosidade dinâmica nas variáveis resposta no planejamento do cultivo com agitação intermitente.	97
Tabela 17 – Principais efeitos causados pela velocidade de rotação e pela viscosidade dinâmica nas variáveis resposta no planejamento do cultivo com agitação contínua.	98
Tabela 18 – Resultados dos cálculos da combinação das respostas nos cultivos da célula RT4 no BVT. Os valores são apresentados em ordem decrescente do valor de FD.	99
Tabela 19 – Resultados dos cálculos da combinação das respostas nos cultivos da célula RT4 no BVT. Os valores são apresentados em ordem decrescente do valor de FD.	99
Tabela 20 – Dados de leituras das viscosidades de meio de cultura quando há adição de dextrana, cálculo da viscosidade média e do desvio padrão amostral.	123

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Duas dimensões; bidimensional
3D	Três dimensões; tridimensional
5-FU	5-fluorouracilo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BEK	Bovine embryonic kidney cell (célula de rim embrionária bovina)
BVT	Biorreator de vórtices de Taylor
CHO	Chinese Hamster Ovary (ovário de hamster chinês)
CO ₂	Dióxido de carbono
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DMEN	Dulbecco's modified eagle médium (meio modificado de água por Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drugs Administration
hMSC	Células estromal mesenquimal humana
INCA	Instituto nacional do câncer
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico (Fosfato de potássio bibásico)
LATECC	Laboratório de tecnologia de cultivo celular
LDA	Laser Doppler anemometry
LDH	Lactate dehydrogenase (desidrogenase láctica)
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaHPO ₄	Fosfato de sódio dibásico (fosfato dissódico)
O ₂	Gás oxigênio
PBS	Solução tampão de fosfato
RWV	Rotatory wall vessel ou biorreator de parede rotatória
SFB	Soro fetal bovino
TPZ	Tirapazamina
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

LISTA DE VARIÁVEIS

A	Área do agregado (μm^2)
ACE	Concentração de esferoide adimensional
ADM	Diâmetro adimensional dos esferoides
C_{dex}	Concentração mássica de dextrana (mg/mL)
C_E	Concentração de esferoides (esf/mL)
C_X	Concentração de células isoladas (cel/mL)
C_{X0}	Concentração de células iniciais (cel/mL)
d	Espaço anular (mm)
d_M	Diâmetro médio (μm)
DM	Diâmetro maior do esferoide (μm)
Esf	Esfericidade
F_g	Fator de correlação
FD	Função desejabilidade
G	Taxa de cisalhamento (h^{-1})
k_{ag}	Constante de agregação (h^{-1})
n_0	Concentração de partículas primárias (part/mL)
n_T	Concentração total de partículas (part/mL)
P	Parâmetro do biorreator de vórtices de Taylor
pH	Potencial hidrogeniônico
q	Taxa de morte específica (h^{-1})
r_1	Raio da partícula primária (μm)
r_i	Raio interno (mm)
r_e	Raio externo (mm)
t	tempo (h)
Ta	Número de Taylor
Ta_{crit}	Valor crítico de Taylor
$Ta_{\text{crit,wavy}}$	Valor crítico de transição para regime de escoamento wavy
$Ta_{\text{crit,turb}}$	Valor crítico de transição para o regime turbulento
V_M	Volume médio (μm^3)
V_{part}	Volume da partícula (μm^3)
y_1	Variável resposta a 90 rpm e 0,80 cP
y_2	Variável resposta a 90 rpm e 1,65 cP
y_3	Variável resposta a 110 rpm e 0,80 cP

y_4	Variável resposta a 110 rpm e 1,65 cP
$\overline{y\Omega}$	Efeito da velocidade de agitação na resposta y
$\overline{y\mu_f}$	Efeito da viscosidade dinâmica na resposta y
$\overline{y\Omega x\mu_f}$	Efeito da interação entre velocidade de agitação e viscosidade na resposta y
\emptyset	Fração volumétrica das partículas
Γ	Razão de aspecto
Ω	Velocidade de rotação (rpm)
ν	Viscosidade cinemática (Pa.s)
μ	Velocidade de crescimento celular (h^{-1})
μ_f	Viscosidade dinâmica (cP)
μ_{app}	Velocidade de crescimento aparente (h^{-1})
τ	Tensão de cisalhamento (Pa)
σ	Razão de raios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Câncer e células tumorais	23
2.2	Câncer de bexiga e a célula RT4	24
2.3	Cultivo de células 2D	26
2.3.1	Utilização do cultivo de células 2D para testes de agentes terapêuticos	27
2.4	Cultivo de células 3D	28
2.4.1	Métodos de produção de esferoides	34
2.4.1.1	Cultura de pellets	34
2.4.1.2	Gota pendente (gota suspensa)	35
2.4.1.3	Sobreposição líquida	36
2.4.1.4	Camadas celulares	36
2.4.1.5	Microfluidos	37
2.4.1.6	Micromoldes de hidrogéis não adesivos	38
2.4.1.7	Formações de esferoides em biorreatores	38
2.4.2	Avaliação do método	39
2.5	Biorreatores para cultivo de células	39
2.6	Biorreator de mistura	40
2.6.1	Biorreator spinner	41
2.6.1.1	Resposta das células a turbulência e hidrodinâmica dos biorreatores	43
2.6.2	Biorreator de regime laminar	46
2.6.3	Biorreator de paredes rotatórias (RWV)	49
2.6.4	Biorreator de vórtices de Taylor (BVT)	51
2.6.4.1	Escoamentos no BVT	52
2.7	Modelagem de agregação de partículas suspensas	57
2.8	Aumento da Viscosidade com adição de aditivos	58
2.9	Consideração Finais	63
3	OBJETIVOS	65
4	MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.1	A linhagem celular	66
4.2	Meios de cultura	66

4.3	Frasco de Cultura	67
4.4	Biorreator de vórtice de Taylor.....	67
4.5	Preservação Celular	72
4.6	Procedimento Padrão dos cultivos estáticos e dos cultivos em biorreator	72
4.6.1	Ativação de linhagem celular RT4	73
4.6.2	Procedimento de preparo do inoculo em frasco T	74
4.6.3	Preparação dos biorreatores.....	74
4.6.4	Condições de cultivos e metodologia de agitação	76
4.7	Métodos analíticos	76
4.7.1	Análise de viabilidade e densidade celular.....	76
4.7.2	Medição do tamanho de agregados e Esfericidade durante o cultivo.....	77
4.7.3	Volume médio dos esferoides e fração volumétrica.....	78
4.7.4	Velocidade específica de aglomeração	79
4.7.5	Quantificação do número de esferoides.....	79
4.7.6	Efeito das variáveis independente nas respostas	79
4.7.7	Otimização pela função desejabilidade	80
4.7.8	Quantificação de glicose e lactato	81
4.7.9	Quantificação de aminoácidos.....	81
4.8	Cultivo no BVT	82
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	83
5.1	Efeito da dextrana em cultivo estático.....	83
5.2	Cultivos e formação de esferoides nos biorreatores	83
5.3	Resultados obtidos referentes as características dos cultivos.....	86
5.3.1	Tempo de duração do cultivo	86
5.3.2	Variação no pH em função do tempo	86
5.3.3	Células livres em suspensão	87
5.3.4	Diâmetro médio em suspensão em função do tempo.	89
5.3.5	Esfericidade	90
5.3.6	Número de esferoides durante o tempo de cultivo	91
5.4	Análise da cinética de agregação da célula RT4	93
5.5	Verificação dos efeitos nas respostas	97
5.6	Combinação das respostas	98
5.7	Análise de glicose, lactato e aminoácidos.....	103

6	CONCLUSÃO.....	107
7	TRABALHOS FUTUROS	108
8	REFERÊNCIAS.....	109
9	APÊNDICE	123

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença responsável por uma alta taxa mundial de morbidade e mortalidade, causando, em 2012, aproximadamente 8 milhões de mortes e dando origem a 14 milhões de novos casos. O câncer vem afetando populações do mundo e há uma projeção de aumento de 70% nas próximas duas décadas devido não só ao crescimento e ao envelhecimento populacional, mas também ao aumento dos fatores de risco, como o uso do tabaco. Como consequências dessas altas taxas de morbidade e mortalidade e da projeção de aumento nos próximos anos, o câncer se apresenta como uma ameaça à estrutura financeira dos sistemas de saúde ao redor do mundo (STEWART; WILD, 2014)

Um dos métodos mais adotados de combate à doença é através do uso de drogas anticancerígenas (INCA, 2016). Para aprovação de um possível fármaco anticancerígeno, este deve passar por testes pré-clínicos (uso de drogas em células ou animais) seguindo normas estabelecidas por órgão reguladores como o Food and Drugs Administration (FDA) nos Estados Unidos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil antes de passar para testes clínicos (teste em pessoas). O atual problema desse procedimento é que, das drogas que chegam ao estágio clínico, 95% são reprovadas, ou seja, nos testes clínicos apenas 5% apresentam a mesma eficiência que nos testes pré-clínicos (HICKMAN et al., 2014). Essa comprovação coloca em evidência a necessidade de aperfeiçoamento do modelo de estudo pré-clínico que vem sendo utilizado.

Tradicionalmente, as drogas anticancerígenas têm sido testadas em modelos de linhagem de células cancerígenas cultivadas em ambientes bidimensionais (2D). No entanto, foi reconhecido que culturas de células cancerígenas 2D não simulam de forma precisa o microambiente dos tumores originais que crescem em um ambiente tridimensional (3D) (IMAMURA et al., 2015; YAMADA; CUKIERMAN, 2007). Acredita-se que células tumorais que crescem em um ambiente 3D mimetiza com mais precisão o tumor original pois há mais semelhança na arquitetura da organização celular (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

A diferença de cultivos de células entre os modelos 2D e 3D é a distribuição espacial em que as células crescem ou se aglomeram. Esse posicionamento acarreta em diversas diferenças biológicas que influenciam a maneira como as células expostas a drogas reagem. As diferenças entre esses comportamentos está bem documentada na literatura sendo algumas delas a morfologia, a proliferação, exposição ao meio, estágio do ciclo celular, expressão gênica e proteica e sensibilidade à droga (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015; BRESLIN;

O'DRISCOLL, 2013; FENNEMA et al., 2013; HICKMAN et al., 2014; KUNZ-SCHUGHART et al., 2004; YAMADA; CUKIERMAN, 2007).

O cultivo de células em 2D começou a ser desenvolvido em 1907 (HARRISON, 1910) e só foi testado com drogas anticancerígenas em 1957 (EAGLE; FOLEY, 1958), mas desde aquela época já se conhecia a baixa correlação entre os modelos *in vitro* e *in vivo*, e isto se refletiu nos testes de citotoxicidade nos modelos *in vitro* e nos testes clínicos realizados nas décadas subsequentes. Porém, devido à ausência de modelos melhores foi sugerido que se utiliza-se as células tumorais cultivadas em 2D como um modelo comparativo (HIRSCHBERG, 1958). O primeiro cultivo 3D registrado foi em 1952 (MOSCONA; MOSCONA, 1952), porém, os modelos 3D para testes de citotoxicidade começou ser mais utilizado a partir do ano 2000.

Ainda não existe uma metodologia aceita com grande unanimidade para o cultivo de células tumorais 3D. No entanto, muitas pesquisas estão sendo feitas e muitas metodologias estão sendo desenvolvidas (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015) para tentar melhorar a confiabilidade dos estudos com células de câncer. O Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celulares (LATECC) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) está atualmente pesquisando o desenvolvimento de um biorreator próprio para produzir esferoides com a linhagem celular RT4 de câncer de bexiga.

Segundo o World Cancer Report de 2014, foi estimado que em 2012, 430.000 pessoas desenvolveram o câncer de bexiga e que houveram 165.000 mortes no mundo devido a esta doença. Sabe-se que esta doença atinge mais homens do que mulheres e que os locais onde mais ocorre a doença é na Europa, América do Norte e China. No Brasil, estima-se que em 2016 houveram 9.670 pessoas que desenvolveram o câncer e 3.642 pessoas que não sobreviveram a doença (INCA – Instituto Nacional do Câncer, 2016).

Testes baseados na tecnologia de cultivo de células têm-se transformado em um importante pilar do descobrimento de drogas de forma mais simples, rápida e econômica em comparação com o uso de testes em larga escala utilizando modelos animais (EDMONDSON et al., 2014). Nos últimos 5 anos o número de medicamentos aprovados por órgãos reguladores do mundo inteiro foi continuamente crescente, atingindo um número total histórico de 127 em 2014. Para o futuro próximo, existe uma previsão de continuidade do crescimento do mercado de novos medicamentos até o ano 2023, especialmente nas áreas de medicamentos oncológicos e cardiovasculares.

Levando em consideração essa demanda crescente ASTASHKINA e GRAINGER, (2014) recomendam o uso de biorreatores com cultivos 3D para melhorar a

qualidade dos dados pré-clínicos derivados de cultivo de células *in vitro* para prever toxicidade. Apesar do abundante conhecimento acumulado e da evidência do sucesso do cultivo de células 3D, a exploração deste modelo de avaliação de toxicidade tem sido muito limitada (MRAKOVCIC et al., 2013). Esta situação abre uma ampla gama de oportunidades para a utilização de biorreatores com conceitos inovadores que atendam as demandas específicas da tecnologia do cultivo de células no campo de Descobrimto de Drogas para tratamento do câncer.

A vantagem do uso de biorreatores em relação a outros métodos de cultivos é que esses equipamentos são escalonáveis e possibilitam a produção de um grande número de esferoides para a realização de vários testes tipicamente necessários na avaliação de drogas. Além disso, requerem baixa manipulação do operador para o cultivo e são adaptáveis para uso em longos tempos de cultivo (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015; SANTO et al., 2016).

O biorreator de vórtices de Taylor (BVT) é um biorreator classificado como pertencente à família dos biorreatores de parede rotatória (rotatory wall vessel ou RWV) e bem qualificado por vários pesquisadores para aplicações de cultivo de células animais em forma de esferoides (CURRAN; BLACK, 2004; FERNANDES et al., 2014; LIU et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011). Um protótipo deste biorreator foi especialmente desenvolvido e patentado no LATECC para ser utilizado em aplicações com células animais. Como atributos inovadores do BVT podem-se citar a capacidade de propiciar cultivos com tensão de cisalhamento uniforme, boa oxigenação e fácil escalonamento. Na análise da literatura não foram encontradas informações sobre cultivos de células tumorais neste biorreator.

O fenômeno de agregação é de grande importância nas áreas de química, ambiental, eletrônica, mineral e biológica; podendo ser definida genericamente como a formação de conjuntos de partículas que entram em contato por colisão e que são mantidas juntas pela ação de forças de sua superfície (ELIMELECH et al., 1995). O estudo da cinética de agregação celular em biotecnologia é de grande relevância atual em aplicações como bioseparações, engenharia de tecido e teste de drogas. O conhecimento da cinética não só fornece uma visão sobre os mecanismos de agregação celular e os parâmetros mais relevantes desse processo, mas também permite fazer uma comparação quantitativa desses mecanismos entre os diversos modelos celulares. Existem na literatura vários estudos de modelos celulares microbianos (WHITTINGTON; GEORGE, 1992) e de células animais não dependentes de ancoramento (HUANG; HELLUMS, 1993; NEELAMEGHAM et al., 1997; NEELAMEGHAM; MUNN; ZYGOURAKIS, 1997), porém, existe pouca informação sobre modelos envolvendo células dependentes de ancoramento (ENMON JR. et al., 2002).

Segundo a teoria (ELIMELECH et al., 1995) a frequência de colisões aumenta proporcionalmente com a taxa de cisalhamento e com o tamanho da partícula, e conseqüentemente, a agregação pode ser incrementada com a agitação do líquido contendo uma suspensão de partículas (ex: células) com tamanhos iguais ou maiores a 10 µm. Este tipo de agregação é conhecido como agregação ortocinética, envolvendo um processo físico que pode ser modelado como uma cinética dependente da concentração de partículas, tipicamente como um fenômeno de primeira ordem.

Como a tensão de cisalhamento tem um papel muito importante na formação de esferoides (MOREIRA et al., 1995a) a modulação desta força através da agitação e da viscosidade do meio de cultura se torna de grande interesse para produção controlada de esferoides com diâmetro e esfericidade apropriados. Aumento de viscosidade também tem sido utilizado para proteção mecânica das células devido às colisões entre agregados e turbilhões formados quando o biorreator é agitado em condições turbulentas (MOREIRA et al., 1995b). Tradicionalmente a modificação da viscosidade de meios de cultura para cultivo e células animais tem sido feita através da adição de polímeros inertes como celulose, amido e dextrana (DOYLE; GRIFFITHS, 1998).

Devido a influência múltipla que tem a viscosidade em vários fenômenos que ocorrem no cultivo de células em biorreator agitado, neste trabalho será avaliado o efeito da adição de dextrana na produção de esferoides de RT4 com um BVT com o intuito de identificar condições favoráveis para a obtenção de agregados com propriedades interessantes para uso na avaliação de efeito funcional e tóxico de fármacos.

A revisão da literatura sobre produção eficiente de esferoides por agregação com células dependentes de ancoramento mostra-se bastante carente de dados. Levando em consideração esse cenário, propõe-se neste trabalho o estudo do caso da linhagem de células tumoral não invasiva RT4 com adição de dextrana na produção de esferoides utilizando um BVT com o intuito de identificar condições favoráveis para a obtenção de agregados com propriedades interessantes para uso na avaliação de efeito funcional e tóxico de fármacos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer e células tumorais

Segundo o instituto nacional do câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Uma característica das células cancerígenas é que elas crescem rapidamente de forma incontrolável, podendo determinar a formação de tumores malignos, que são acúmulo de células cancerosas, ou neoplasias malignas além de poder se espalhar por outras regiões do corpo, invadindo tecidos e órgãos (metástase). Em contrapartida, o tumor benigno é uma massa localizada de células que se multiplica vagarosamente e que se assemelha ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida ao paciente.

Por haver vários tipos de células no corpo, existem muitos tipos de câncer. Existem, por exemplo, diversos tipos de câncer de pele, pois a pele é formada por mais de um tipo de célula. Assim, os tumores podem ter início em diferentes tipos celulares, sendo que se define como carcinoma se sua origem for de tecidos epiteliais como pele ou mucosas, como sarcoma se tem início em tecidos conjuntivos como ossos, músculo ou cartilagem (INCA, 2016).

As causas do câncer são variadas, sendo inter-relacionadas de forma interna e externamente. Dentre as causas externas estão os hábitos e costumes de uma sociedade em relação ao meio ambiente. Já as causas internas, normalmente, são determinadas geneticamente e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2016).

O surgimento do câncer ocorre quando uma célula normal sofre uma mutação genética, que é a alteração no ácido desoxirribonucleico (DNA). As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenese, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis por transformar células normais em células malignas (INCA, 2016).

Geralmente as células cancerosas são menos especializadas nas funções do que suas correspondentes normais e conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. A invasão dos pulmões gera, por exemplo, alterações respiratórias e, a invasão do cérebro gera dores de cabeça, convulsões, alterações da consciência entre outras alterações (INCA).

Sabe-se, no entanto, que o câncer tem uma alta taxa de morbidade e mortalidade (STEWART; WILD, 2014) e que um dos tratamentos para combater a doença é a quimioterapia, abordagem baseada na utilização de medicamentos para destruir as células doentes que formam o tumor (INCA, 2016). Contudo, há um problema em relação às descobertas de novas drogas anticancerígenas devido ao fato de que em torno de 95% das novas drogas anticancerígenas desenvolvidas falham nos testes clínicos, sendo que boa parte dessas mesmas drogas apresentaram resultados positivos nos testes pré-clínicos, realizados em modelos *in vitro* (HICKMAN et al., 2014).

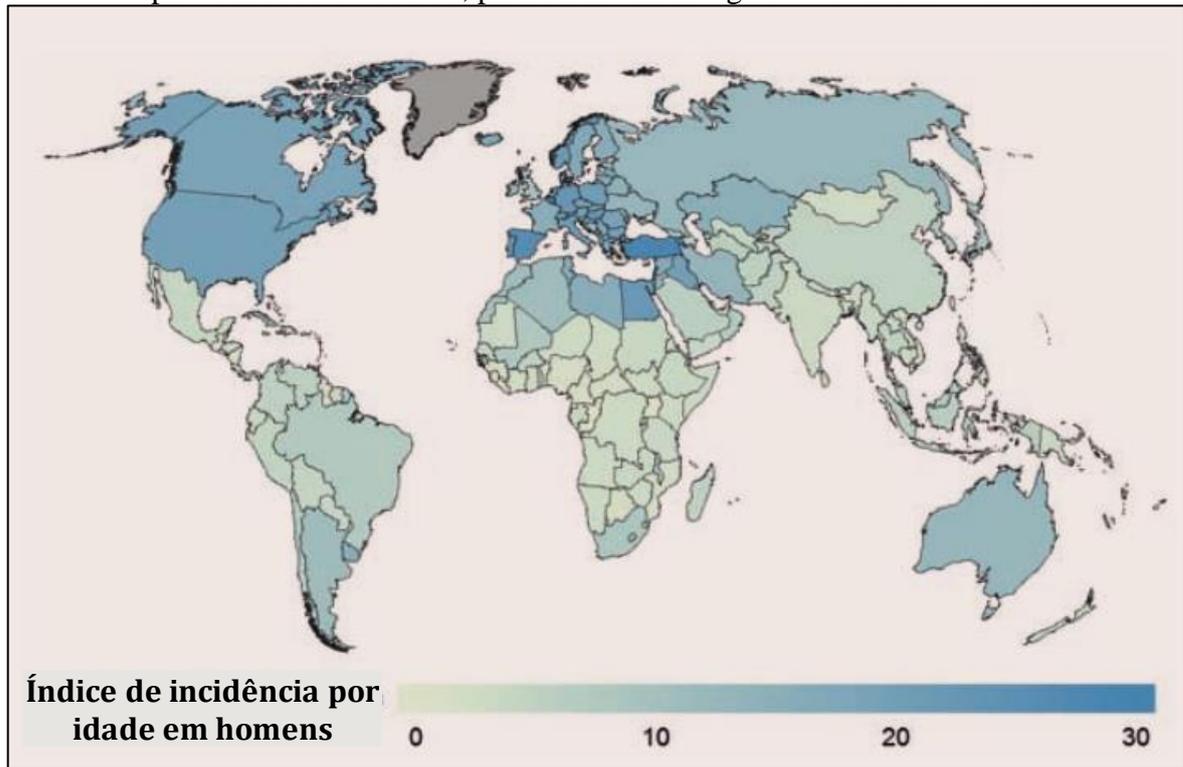
A descoberta de novos fármacos em análise pré-clínica (quando os medicamentos são testados em células) depende quase inteiramente do uso de modelos *in vitro*, que são desempenhadas através de linhagem celular que tentam recapitular a patologia em uma forma reducionista (WILDING; BODMER, 2014). Para que moléculas candidatas a novos fármacos sejam escolhidas para teste de eficácia *in vivo*, é interessante testar essas moléculas previamente em linhagem celular e para a execução do teste é necessário o cultivo das células cancerígenas (HICKMAN et al., 2014).

2.2 Câncer de bexiga e a célula RT4

Segundo o World Cancer Report de 2014, mundialmente o câncer de bexiga está na nona posição em novas ocorrências e na décima terceira posição em causas de óbitos, utilizando como referência outros tipos de câncer e o carcinoma urotelial é o que ocorre com uma frequência maior que 90% dos casos. Em torno de 70% a 80% dos pacientes são diagnosticados com tumores não invasivos e de baixo grau. Porém, a probabilidade de recorrência e progressão para tumores de crescimento invasivo deve ser reconhecida. Cerca de 50% a 70% desses tumores recorrem após o tratamento e cerca de 10% a 20% progridem para uma doença muscular invasiva e apenas de 30% a 40% dos pacientes sobrevivem. O tempo de vida desses pacientes está em torno de cinco ou mais anos (STEWART; WILD, 2014).

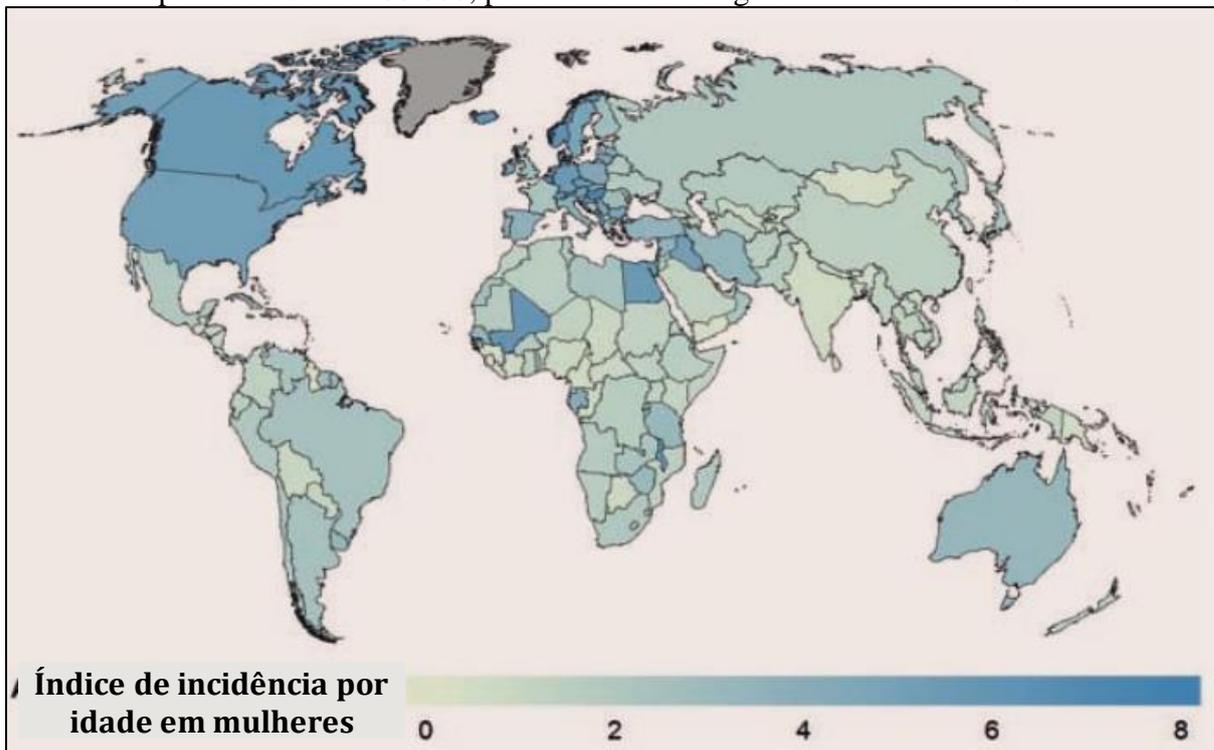
Foi estimado que 430.000 pessoas desenvolveram a doença e que houve 165.000 óbitos devido ao câncer de bexiga. O índice de incidência e mortalidade são mais elevados na América do Norte, Europa, no norte da África, Oriente Médio, Austrália e Nova Zelândia. Essas taxas tendem a ser relativamente baixas em boa parte da África e Ásia e alguns países da América Latina (Figura 1, Figura 2 e Figura 3). A incidência e mortalidade da doença em homens está em torno de 2 a 4 vezes maior que nas mulheres.

Figura 1 – Mapa da distribuição estimada padronizada por uma taxa de índice de incidência por idade sobre 100.000, para câncer de bexiga em homens em 2012.



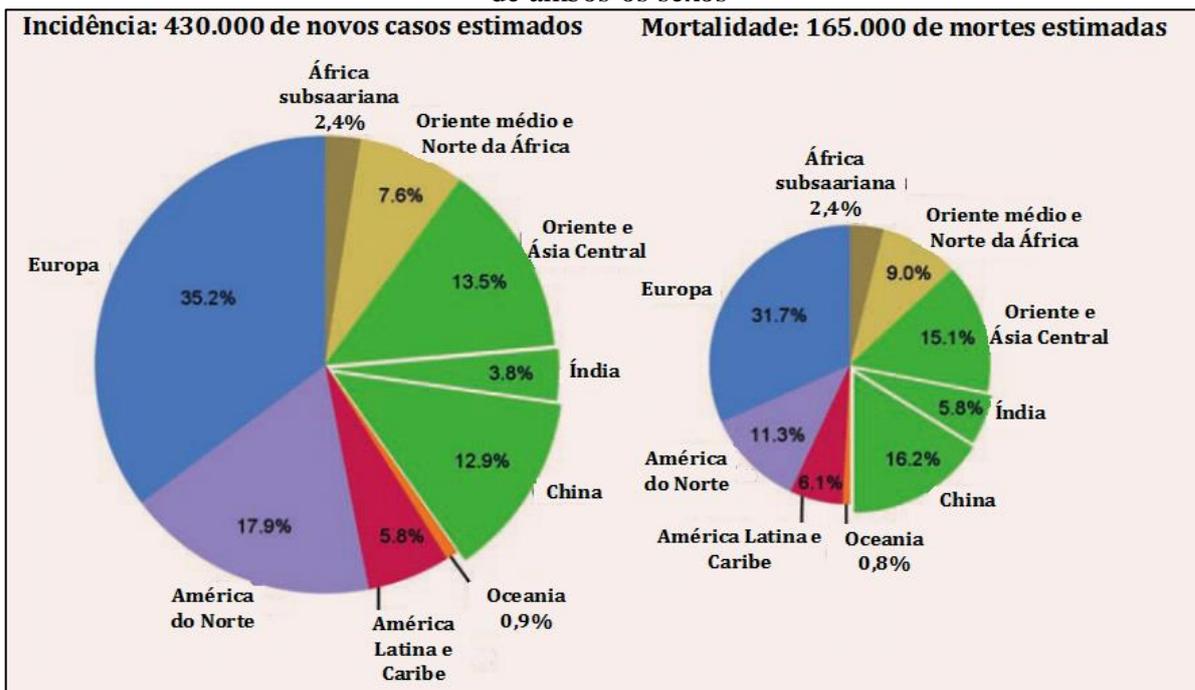
Fonte: WORLD CANCER REPORT, 2014.

Figura 2 – Mapa da distribuição estimada padronizada por uma taxa de índice de incidência por idade sobre 100.000, para câncer de bexiga em mulheres em 2012.



Fonte: WORLD CANCER REPORT, 2014.

Figura 3 – Estimativa numérica de 2012 global de novos casos e óbitos para câncer de bexiga de ambos os sexos



Fonte: WORLD CANCER REPORT 2014

No Brasil, o INCA havia estimado que em 2016 haveria 9.670 novos casos de câncer de bexiga, sendo 7.200 homens e 2.470 mulheres. Estima-se também que há 3.642 casos de óbitos, sendo 2.542 homens e 1.099 mulheres.

Das linhagens celulares do câncer urotelial, duas são as mais estudadas, a linhagem RT4 e a T24. As células RT4 representam um modelo não invasivo das células papiloma e as células T24 representam um modelo invasivo das células de carcinoma (RESNIK et al., 2015). Apesar das células T24 representarem um perigo maior, as células RT4 representam um tratamento mais relevante pois representam 90% dos tumores de bexiga (YU et al., 2016). A linhagem celular RT4 representa o tecido da bexiga e é originária de um homem branco de 63 anos uma célula do tecido epitelial e é aderente. (RIGBY; FRANKS, 1970).

Na literatura já há estudo dos testes de drogas em modelos 2D para a linhagem de células RT4 (RESNIK et al., 2015; VIANNA et al., 2015), porém o estudo com modelos de cultivo 3D é reduzido. Um dos motivos é devido à falta um protocolo adequado para a reprodução destas células no modelo 3D.

2.3 Cultivo de células 2D

O processo de cultivo de células foi desenvolvido por Ross Granville Harrison, em 1907 enquanto pesquisava fibras neurais de sapo. O pesquisador utilizou tecido neural de

embrião de rã e colocou o tecido em uma lamínula com uma gota de linfa, vedou com parafina e manteve a lamínula em um ambiente úmido (HARRISON, 1907). A importância deste método foi devido a demonstração da possibilidade de cultivar uma célula de interesse fora de seu organismo de origem (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Durante os anos, muitas alterações foram realizadas para melhorar o cultivo de células em monocamadas. Primariamente, utilizava-se apenas plasma sanguíneo como fonte de nutrientes para o crescimento das células e com o passar do tempo o plasma foi substituído por meio sintético, que é mais fácil de produzir e não contém antígenos que podem causar reações alérgicas nas células e são significativamente mais baratos. Outra grande mudança foi a substituição das lamínulas por frascos de cultura, que facilitam a troca de meio para fornecer mais nutrientes às células além de fornecer um espaço maior para o seu crescimento (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Atualmente os cultivos de células em monocamadas são feitos majoritariamente realizados em frascos T (Figura 4), utilizando meios sintéticos que são usualmente suplementados com soro fetal bovino (SFB) e glutamina, e os frascos com células são mantidas em um ambiente a uma temperatura e umidade controlada (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Figura 4 - Frascos T. Frascos utilizados para cultivar células em monocamadas (2D)



Fonte: Acervo pessoal.

2.3.1 Utilização do cultivo de células 2D para testes de agentes terapêuticos

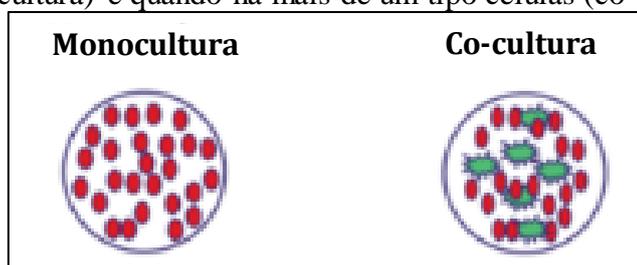
O cultivo de células 2D *in vitro* utilizando frascos e meio sintéticos para testar fármacos foi introduzido em 1958 (EAGLE; FOLEY, 1958; HIRSCHBERG, 1958). Comparando-se o resultado das drogas aplicadas nas células cultivadas *in vitro* com as células *in vivo*, notou-se que os resultados não eram muito semelhantes. No entanto devido à falta de

informações de outros métodos mais confiáveis, o método de cultivo de células 2D se manteve em para fins comparativos (HIRSCHBERG, 1958).

Em 1977, foi realizado um cultivo no qual células tumorais isoladas foram cultivadas em solução de ágar para um crescimento semelhante a colônias (HAMBURGER; SALMON, 1977). Apesar do método ter sido considerado um grande avanço no cultivo de células, este método foi considerável inviável pois a eficiência de plaqueamento foi baixa e esta metodologia não é adequada quando se almeja obter uma grande quantidade de células (SHOEMAKER et al., 1985). Além disso, este método apresenta uma previsibilidade limitada para o testes de drogas anticancerígenas nas células, pois as colônias de células cancerígenas não mimetizam bem o ambiente das células *in vivo* devido à ausência de interações celulares (HICKMAN et al., 2014).

Apesar do cultivo de células em 2D (Figura 5) ter sido muito utilizado nas últimas décadas, tanto para monocultura quanto para co-cultura, sua capacidade de mimetizar organismo *in vivo* está sendo questionada já que sua geometria é muito diferente dos tumores *in vivo*, o que pode resultar em diferentes funções exercidas pelas células (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Por este motivo, muitas metodologias têm sido pesquisadas e desenvolvidas para que as células sejam cultivadas em um ambiente 3D, que são mais representativas aos modelos *in vivo*.

Figura 5 – Modelo de cultivo de células em 2D quando há apenas um tipo de células (monocultura) e quando há mais de um tipo células (co-cultura).



Fonte: HICKMAN et al., 2014

2.4 Cultivo de células 3D

A mudança de cultivar células em monocamadas para cultivá-las em um ambiente tridimensional (3D) vem da necessidade de se trabalhar com modelos celulares que mimetizem as funções dos tecidos vivos. Estudos e pesquisas feitos nas últimas décadas, mostraram que o crescimento de células em um ambiente 3D reduz a “lacuna” entre cultura de

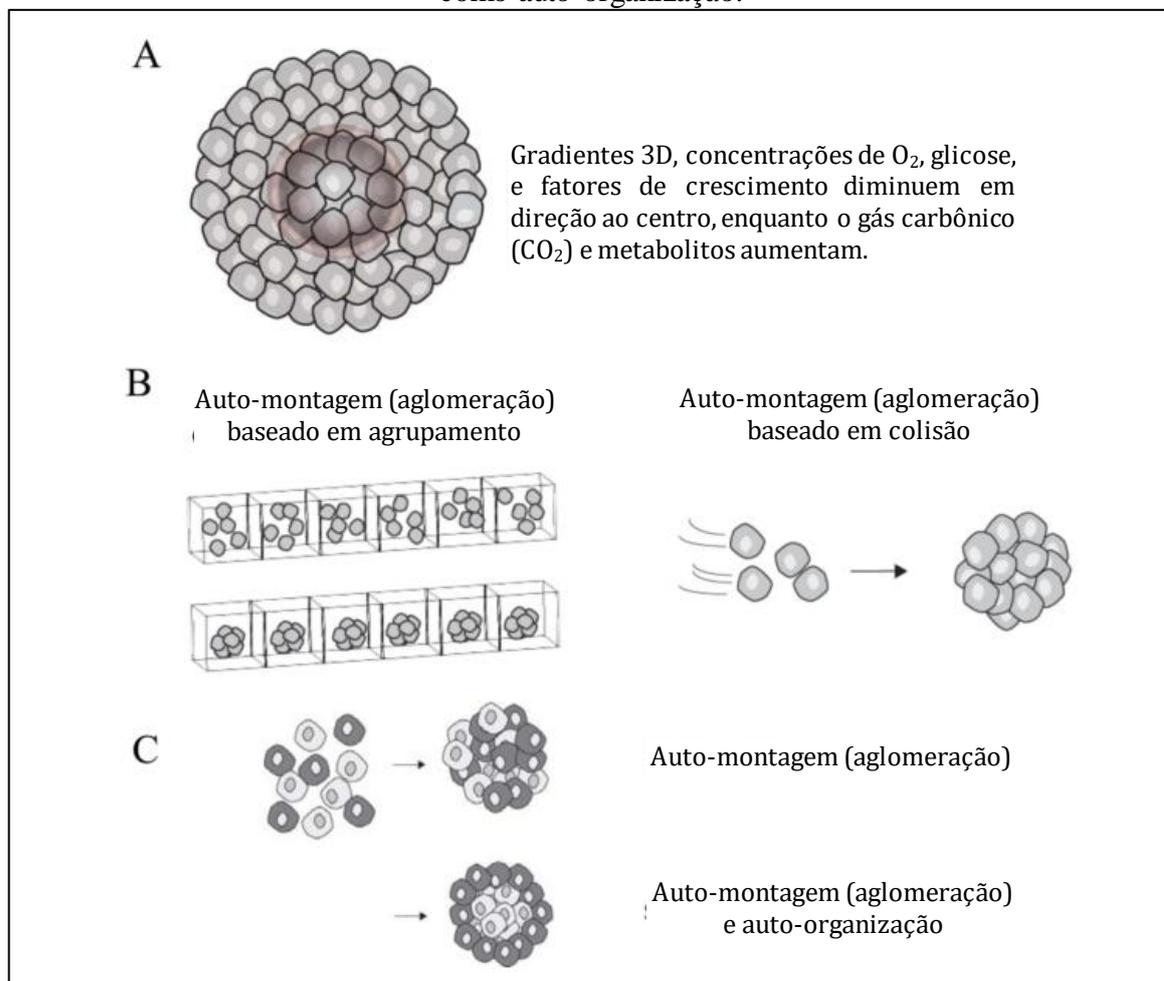
células e tecidos fisiológicos (PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007). Por este motivo é importante entender as condições e mecanismo que ocorrem no cultivo 3D.

Na ausência de uma superfície de aderência, as células tendem a um processo de agregação (MOSCONA; MOSCONA, 1952). Nesse processo, células isoladas em suspensão tendem a formar microtecidos 3D chamados de esferoides multicelulares (DUGUAY; FOTY; STEINBERG, 2003) como ilustrado na Figura 6.

Um exemplo de semelhança entre os esferoides e os tecidos *in vivo* é o microambiente de ambos, pois em ambos há a formação de gradientes moleculares. Os gradientes de componentes solúveis no meio de cultura como gás oxigênio (O₂), nutrientes e fatores de crescimento, assim como os gradientes de metabólitos produzido pelas células são estabelecidos pelas barreiras impostas pelos esferoides, assim como as taxas de consumo e produção desses fatores (GRIFFITH; SWARTZ, 2006).

Outra semelhança dos esferoides com tecidos *in vivo*, vem da interação dos complexos célula-célula e das adesões células com a matriz extracelular. Ambos auxiliam simultaneamente nas comunicações de sinais que incluem forças mecânicas, sinais bioquímicos e acoplamentos elétricos que podem influenciar na forma da célula, bem como em sua motilidade, proliferação, diferenciação e expressão gênica (PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007).

Figura 6 – Desenho esquemático do esferoide e seu mecanismo de formação. (A) Esferoide multicelular, a organização concêntrica de células proliferativas e necróticas. (B) Formação dos esferoides baseada em aglomeração por agrupamento (cultivo estático) e aglomeração baseada em colisão (cultivo dinâmico). (C) Padrão de aglomeramento que ocorre é referido como auto-organização.



Fonte: ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015

Quando dois tipos diferentes de células se auto-montam, elas frequentemente se auto-organizam e se compactam em diferentes regiões dos esferoides (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015). O mecanismo da auto-montagem é explicado através de eventos moleculares, em que proteínas como caderinas são responsáveis pela adesão entre células. Diferentes concentrações dessas proteínas, controlam a auto-organização das células no esferoide, em que uma alta concentração da proteína faz com que as células se desloquem ao centro do esferoide, e uma baixa concentração faz com que elas se desloquem para a superfície do esferoide (DUGUAY; FOTY; STEINBERG, 2003; FOTY; STEINBERG, 2005). Outras proteínas, como a conexina 43, criam uma junção adesiva entre pares de célula e o efeito desta proteína age em conjunto com as caderinas (BAO et al., 2011). O citoesqueleto age de maneira ativa na auto-montagem (DEAN; MORGAN, 2008). De maneira geral, a adesão superficial

entre as moléculas e a rede de citoesqueleto agem em conjunto para o mecanismo de auto-montagem e auto-organização, sendo que as forças mecânicas entre as células desempenham um papel importante nesse processo (PEDERSEN; SWARTZ, 2005).

Esferoides de células tumorais têm sido usados como modelo *in vitro* para mimetizar a complexidade dos tumores (SUTHERLAND, 1988). Esferoides mistos são usados para o estudo das interações células tumor-estroma e esses esferoides mistos apresentam perfis de forma, arquitetura e expressão gênica similares ao modelo *in vivo* (BIRGERSDOTTER; SANDBERG; ERNBERG, 2005). Um exemplo é a célula de câncer de mama, que quando cultivada com fibroblasto, apresenta um fenótipo invasivo, formando tecidos similares com tecidos de câncer primário (KAUR et al., 2011). Células de tumores endoteliais tridimensionais são usadas para medir o potencial de metástase de tumores e a presença de células endoteliais as torna mais resistentes a quimioterapia e a radiação (UPRETI et al., 2011).

O modelo 3D de células cancerígenas é utilizado para desenvolvimento de novos fármacos e para o estudo do transporte destes fármacos nos esferoides. Na maioria dos casos, as células dos esferoides tendem a ser mais resistentes do que as células em monocamadas (ELLIOTT; YUAN, 2011). Esse resultado foi demonstrado com as drogas paclitaxel, as quais apresentam efeitos maiores em células no modelo de monocamadas do que no modelo de esferoides, quando cultivadas com a mesma célula (WONG et al., 2011). O motivo da resistência é devido à dificuldade da penetração da droga nas regiões mais internas dos esferoides (TUNGGAL et al., 1999) e também devido ao fenótipo celular que é induzidos pelo gradiente de hipóxia e as diferenças na proliferação e no contato entre células e expressão gênica (HUANG et al., 2010) (MINCHINTON; TANNOCK, 2006). Outro fator que auxilia na resistência de agentes citotóxicos é a produção de proteínas da matriz extracelular, visto que essas proteínas podem expressar resistência a algumas drogas (LONGATI et al., 2013). Os modelos de esferoides têm o potencial de alto rendimento e alto conteúdo de prever as respostas de diferentes regimentos terapêuticos (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

Em um outro exemplo, células 2D e 3D foram expostas a droga 5-fluorouracilo (5-FU) na concentração de 10 μ M. Nas células 2D, 95% das células são mortas após 96 horas de tratamento. No tratamento com as células 3D, nas mesmas condições, 25% das células foram mortas, indicando que os esferoides 3D são mais resistentes ao efeito proliferativo do 5-FU do que as células 2D (TUNG et al., 2011).

Em contrapartida, as células que foram tratados com Tirapazamina (TPZ), na concentração de 10 μ M, em um período de 96 horas, mostraram resultados diferentes, já que no cultivo 2D, as células mostraram uma viabilidade de 72% enquanto nas mesmas condições

para o cultivo 3D, as células apresentaram 40% de viabilidade. O motivo desta substância apresentar resultados melhores para cultivos 3D do que para o cultivo 2D se deve ao mecanismo de ação da droga nas células, já que o TPZ é uma toxina ativado por hipóxia e consequentemente, os esferoides são mais sensíveis ao TPZ já que em seu núcleo, as células estão com deficiência de O₂ (TUNG et al., 2011).

Através destes dados, percebe-se que a maneira em que as células são cultivadas pode alterar o efeito da droga. Adicionalmente é mostrado que as células que são cultivadas em 3D não apresentam necessariamente uma resistência maior as drogas, mas sim uma combinação entre o mecanismo de ação da droga e o ambiente celular, que influenciam na reação das drogas nas células (TUNG et al., 2011).

Assim como nos esferoides, os tumores apresentam um centro de hipóxia que ocorre devido à baixa difusão de O₂ nas células centrais da massa cancerígena, já que o limite de difusão de O₂ é de aproximadamente 200 µm (WILSON; HAY, 2011). Mais de 60% das massas tumorais apresentam regiões de hipóxia em sua estrutura (VAUPEL; MAYER, 2005). Esses dados apoiam a ideia de que é necessário realizar testes de fármacos nos modelos de tumores no formato de esferoide 3D, já que a hipóxia tem uma diversidade de efeitos na biologia dos tumores, podendo ocasionar uma alteração respostas às drogas (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Realizou-se uma comparação da distribuição de drogas anticancerígenas em tumores e em esferoides (THURBER; WITTRUP, 2008). Os resultados destes testes foram semelhantes, o que indica que esferoides tem utilidade para testes e desenvolvimento de drogas *in vitro* (LEE et al., 2009; SMALLEY; LIONI; HERLYN, 2006).

Os esferoides também estão sendo utilizados na engenharia de tecido inclusive para projetos de produção de órgãos (LAYER et al., 2002). Algumas células como cultura de hepatócitos, perdem a capacidade de se diferenciar quando cultivada em monocamadas, porém essas células mantêm essa função caso seja cultivado em esferoides.

Os esferoides 3D fornecem muito mais informações biológicas se comparados com as células em monocamadas 2D, já que sua geometria esférica e sua simetria radial permitem um mapeamento das funções celulares. Porém, a metodologia para análise de imagens em esferoides é mais complexa do que em monocamadas (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015). Vários métodos de análises estão sendo usados para analisar os esferoides, como a microscopia eletrônica e a microscopia por contraste. Na microscopia eletrônica, por exemplo, imagens de baixa resolução fornecem características como diâmetro, forma e organização superficial de cada esferoide, enquanto que as imagens de alta resolução fornecem

características mais específicas como a porosidade do esferoide. Na microscopia por contraste, mede-se as dimensões x e y de cada esferoide e microscópio. Na microscopia por lapsos de tempo são utilizados para visualizar e quantificar o auto-montamento dos esferoides (NAPOLITANO et al., 2007). Como os esferoides apresentam uma dimensão z, microscópios com vista lateral também são utilizados (ACHILLI et al., 2012).

Para a determinação da velocidade de crescimento de esferoides, algumas metodologias têm sido utilizadas, como o método da desagregação e o método de medição. No método de desagregação, enzimas são utilizadas para dissociar as células e a partir dessa desaglomeração, é possível contar o número de células. Este método pode apresentar problemas dependendo do tipo celular que se deseja desagregar, já que em alguns casos as células não se dissociam facilmente. No método de medição, imagens são utilizadas para determinar as dimensões dos esferoides e essas dimensões variam de acordo com o crescimento dos esferoides. O problema deste método é que os esferoides podem aparentar uma esfera nas dimensões x e y, porém se considerar a dimensão z, nota-se que os esferoides são esferas achatadas (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

Atualmente, modelos matemáticos e simulações computacionais têm sido desenvolvidos com a finalidade de entender melhor o mecanismo de formação dos esferoides. Uma modelagem que tem sido utilizada por diversos grupos (CHEN et al., 2007; POPLAWSKI et al., 2007; ZAJAC; JONES; GLAZIER, 2003) simulam os processos de auto-montagem e auto-organização. Um modelo de simulação sugere que as células se agregam devido as diferenças entre adesão célula-células ou da tensão superficial aparente, ou seja, as células com alta coesão, se organizam dentro dos esferoides e as células com baixa coesão, se organizam na parte externa do esferoide (FOTY et al., 1996; FOTY; STEINBERG, 2005; GRANER; GLAZIER, 1992; KLEINMAN; PHILP; HOFFMAN, 2003).

Modelos matemáticos também têm sido utilizados para um melhor entendimento da biologia das células cancerígenas. Essas modelos simulam os gradientes de concentrações e microambientes formados nos esferoides. Baseado nas concentrações de O₂, nutrientes e metabólitos, esses modelos oferecem mecanismos de crescimento de células tumorais, diferenciações, proliferações e apoptoses (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

Diversos modelos de simulação para o transporte de drogas em esferoides estão em desenvolvimento. A distância nas quais as drogas devem percorrer para atingir todas as células em células cultivadas em monocamadas é pequena se comparado a tecidos *in vivo* onde a droga deve penetrar diversas camadas até atingir o centro do tumor (MUELLER-KLIESER, 1987). É reconhecido na maioria dos casos que o cultivo de células cancerígenas em 2D é muito

mais sensível ao tratamento de drogas que o modelo 3D, já que as monocamadas não replicam adequadamente os obstáculos encontrados *in vivo* durante o transporte de drogas (ELLIOTT; YUAN, 2011)

A Tabela 1 descreve as principais diferenças entre as características das células cultivadas em um ambiente 2D e 3D.

Tabela 1 – Principais diferenças nas características das células em processos de cultura 2D e 3D.

CARACTERÍSTICA CELULAR	2D	3D
MORFOLOGIA	Monocamadas	Estrutura de agregados/esferoides
PROLIFERAÇÃO	Prolifera mais rapidamente que o <i>in vivo</i>	Pode proliferar mais rápido ou devagar comparando com o modelo 2D dependendo do tipo de célula e o modelo 3D
EXPOSIÇÃO AO MEIO/DROGAS	Expostas igualmente aos nutrientes/fatores de crescimento/drogas	Nutrientes, fatores de crescimento ou drogas podem não penetrar nos esferoides
ESTAGIO DO CICLO CELULAR	A maioria das células estão no mesmo estágio de ciclo celular	Esferoides contém células proliferativas, em hypoxia e necróticas
EXPRESSÃO GÊNICA/PROTEICA	Diferentes dos <i>in vivo</i>	Similares ao <i>in vivo</i>
SENSIBILIDADE A DROGA	Normalmente drogas são efetivas	Mais resistente se compara ao modelo 2D

Fonte: EDMONDSON et al., 2014

2.4.1 Métodos de produção de esferoides

Algumas técnicas têm sido desenvolvidas para agregação de células sem o auxílio de scaffolds, como microcarregadores ou géis de suporte (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

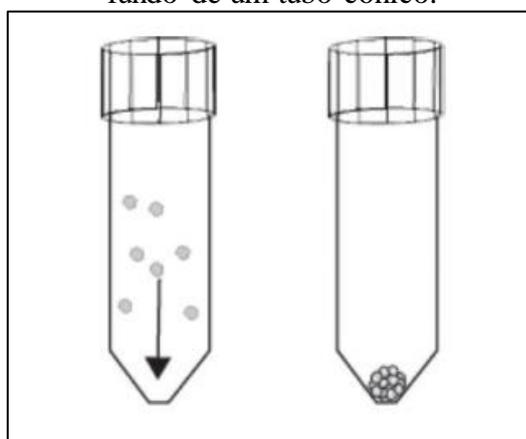
2.4.1.1 Cultura de pellets

Essa técnica usa a força centrífuga para concentrar as células no fundo de um tubo, maximizando a interação célula-célula para agregação, como ilustrado na Figura 7. Para

a formação dos esferoides, o fundo do tubo deve ser cônico e a velocidade de agitação deve ser de 500g por 5 minutos (LI; HE; PEI, 2011). Esse método é utilizado para estudar a condrogênese (formação de cartilagem), formação de osso e diferenciação celular de células mesenquimais (GIOVANNINI et al., 2010; LI; HE; PEI, 2011).

Esta metodologia é utilizada para formação de esferoides relativamente grandes e devido ao tamanho elevado, há uma região de baixa concentração de O_2 no centro do esferoide. No caso da condrogênese, a diferenciação celular pode ser estimulada pela baixa concentração de O_2 , mas para outros tipos de células, a hipóxia pode causar necrose no centro do esferoide (MARKWAY et al., 2010; SCHROBBACK et al., 2012). Outro inconveniente deste método é a impossibilidade de escalonamento para obtenção de grande quantidade de esferoides.

Figura 7 – Utilização de força centrífuga para forçar as a acumulação e agregação delas no fundo de um tubo cônico.



Fonte: ACHILLI et al., 2012

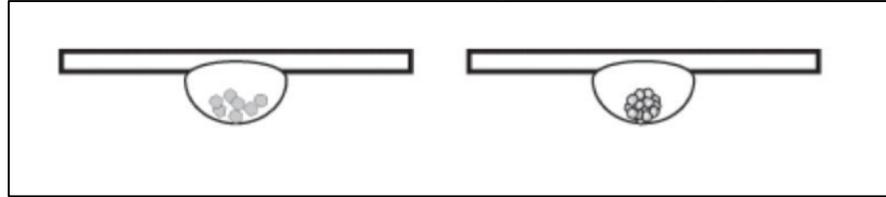
2.4.1.2 Gota pendente (gota suspensa)

O método da gota pendente utiliza a força da gravidade para a formação dos esferoides (KELM et al., 2003). O procedimento de formação de esferoides ocorre pipetando uma quantidade de células na tampa de uma placa de cultura. A tampa é posteriormente invertida, e as gotas se mantêm na mesma devido a tensão superficial. A força da gravidade auxilia na concentração de células no fundo da gota formando um único esferoide (Figura 8). O tamanho do esferoide depende da concentração celular de cada gota (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015). Este método já foi utilizado para a formação de esferoides tanto de células primárias quanto para linhagem celulares (KELM; FUSSENEGGER, 2004).

Por este método é possível obter um bom controle do diâmetro de esferoide já que este depende diretamente da densidade de células presentes na gota. Porém, este método

não é adequado para uma grande produção de esferoides e requer uma alta manipulação do operador (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

Figura 8 – Desenho esquemático da formação de esferoide por gota pendente.



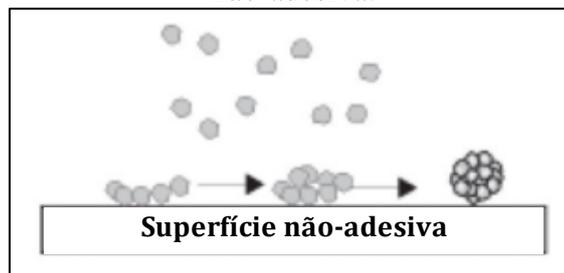
Fonte: ACHILLI et al., 2012

2.4.1.3 Sobreposição líquida

Este método inibe a aderência das células na superfície de cultura e com isso promove a agregação celular. As células suspensas são inoculadas em uma placa de cultura com uma superfície de baixa adesividade, como exemplo a agarose (ENMON JR et al., 2001). Seu mecanismo é apresentado na Figura 9.

As placas são fixadas com células sobrepostas à sua superfície. Com uma pequena agitação da placa, as células vão se agregando com o tempo até formarem esferoides. Este método já foi utilizado tanto para células primárias quanto para linhagem celulares (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015). A vantagem deste método é a facilidade de manuseamento e a grande desvantagem é a heterogeneidade no formato e nos diâmetros dos esferoides.

Figura 9 – As células se aglomeram entre elas devido ao fato de estarem sobre uma superfície não-adesiva.



Fonte: ACHILLI et al., 2012

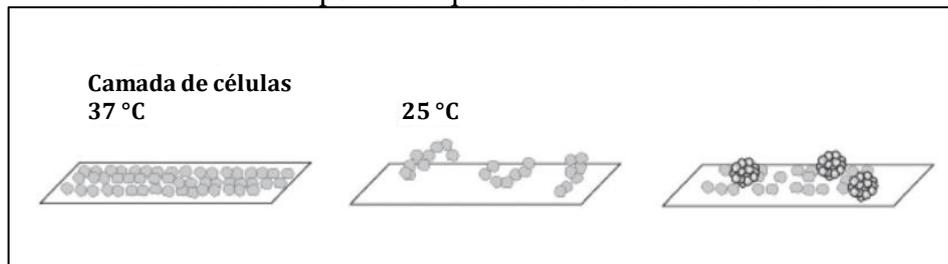
2.4.1.4 Camadas celulares

Esse método consiste em cultivar as células em um polímero que possuía habilidade de alterar suas características de acordo com a temperatura, como o N-

isopropilacrilamida. Para temperaturas abaixo de 32 °C, este polímero tem uma característica hidrofílica e para temperaturas acima de 32 °C, o polímero tem uma característica hidrofóbica.

Neste processo, as células são primeiramente cultivadas na superfície do polímero a uma temperatura de 37 °C. Após formar uma camada contínua de células, a temperatura é reduzida para 25 °C por uma hora o que causa a liberação da camada contínua. Posteriormente, as pequenas camadas de células que foram desprendidas são incubadas em uma superfície não adesiva, onde são compactadas em esferoides, como evidenciado na Figura 10 (PARK et al., 2005).

Figura 10 – Desenho esquemático da formação de esferoides por camadas celulares com auxílio de um polímero que muda suas características.

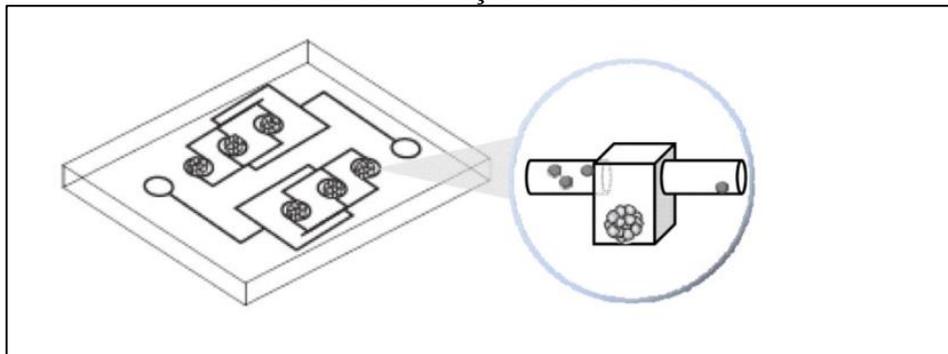


Fonte: ACHILLI et al., 2012

2.4.1.5 Microfluidos

Neste método, as células fluem por uma rede de micro-canais até micro-câmaras onde elas expostas a um fluido micro-rotacional, o que causa a agregação das células Figura 11 (OKUYAMA et al., 2010).

Figura 11 – As células fluem por uma rede de micro-canais e quando chegam nas micro-câmaras, as células são expostas a um fluido micro-rotacional o que causa a colisão célula-células e a formação de esferoides.



Fonte: ACHILLI et al., 2012

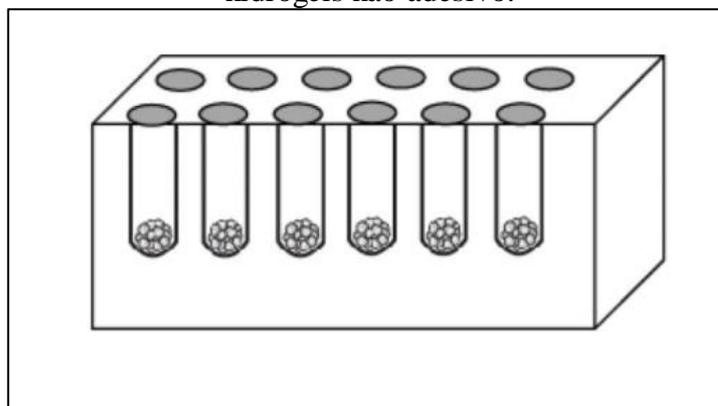
Como as micro-câmaras podem ser equipadas com biosensores, há um alto controle em relação ao tamanho do esferoide. Além disso, o sistema de perfusão permite um

bom controle em relação a tensão de cisalhamento e também em relação aos fatores solúveis nos esferoides (AGASTIN et al., 2011; JIN et al., 2011; TOH et al., 2007).

2.4.1.6 Micromoldes de hidrogéis não adesivos

Micromoldes feitos com hidrogéis não adesivos tem sido utilizados para a produção de esferoides e microtecidos com uma variedade de formas, dependendo da geometria do molde (DEAN et al., 2007) (NAPOLITANO et al., 2007). A Figura 12 ilustra os micromoldes em que as células são inseridas. As células se acomodam no fundo dos moldes e devido à impossibilidade de adesão nos hidrogéis, as células se aderem uma nas outras, formando esferoides (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

Figura 12 – Desenho esquemático da formação de esferoides utilizando micromoldes de hidrogéis não adesivo.



Fonte: ACHILLI et al., 2012

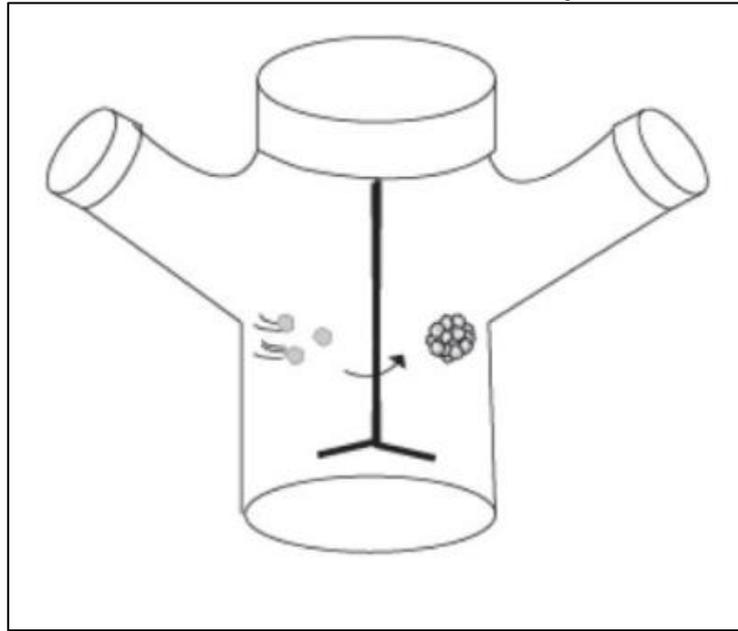
Esse método pode ser escalonado para a produção de até 822 esferoides em um único molde, com formas, tamanhos e composições celulares homogêneas (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

2.4.1.7 Formações de esferoides em biorreatores

Em um biorreator, o meio líquido no qual as células estão presentes está em constante agitação devido a movimentação do impelidor. A agitação no líquido mantém as células em suspensão e promove a colisão célula-célula, formando assim os esferoides, como apresentado na Figura 13 (CASTAÑEDA; KINNE, 2000; FOTY; STEINBERG, 2005). Os biorreatores normalmente são inoculados com células isoladas e a transferência de massa é realizado por forças convectivas gerado pelos impelidores ou barras magnéticas. Para contornar esse problema de elevada tensão de cisalhamento, outros modelos de biorreatores têm sido projetados.

O grande inconveniente deste método é que a agitação causa altos picos de tensões de cisalhamento, o que dificulta o uso deste método para as células mais sensíveis. Devido a constante agitação, a formação de cada esferoide não pode ser monitorada. Este método, porém, oferece grandes vantagens pois ele pode ser escalonado e, desta maneira, produzir uma grande quantidade de esferoides (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

Figura 13 – Formação de esferoide em um cultivo dinâmico. Os esferoides se formam devido a colisão célula-célula devido a movimentação do fluido.



Fonte: ACHILLI et al., 2012.

2.4.2 Avaliação do método

Para aumentar a relevância dos cultivos de células 3D *in vitro* é importante avaliar a recriar da arquitetura de microambientes dos métodos. Essa avaliação inclui não só a arquitetura 3D, nutrientes e componentes da matriz extracelular, mas também deve manter parâmetros que podem influenciar na resposta de agentes terapêuticos como temperatura (GETZENBERG; COFFEY, 2011), pH (SONG; GRIFFIN; PARK, 2006) e O₂ (ZENG et al., 2015). Acredita-se que o cultivo em biorreatores possa satisfazer essas condições e dos métodos citados, ele é o que tem maior produtividade de esferoides (HICKMAN et al., 2014).

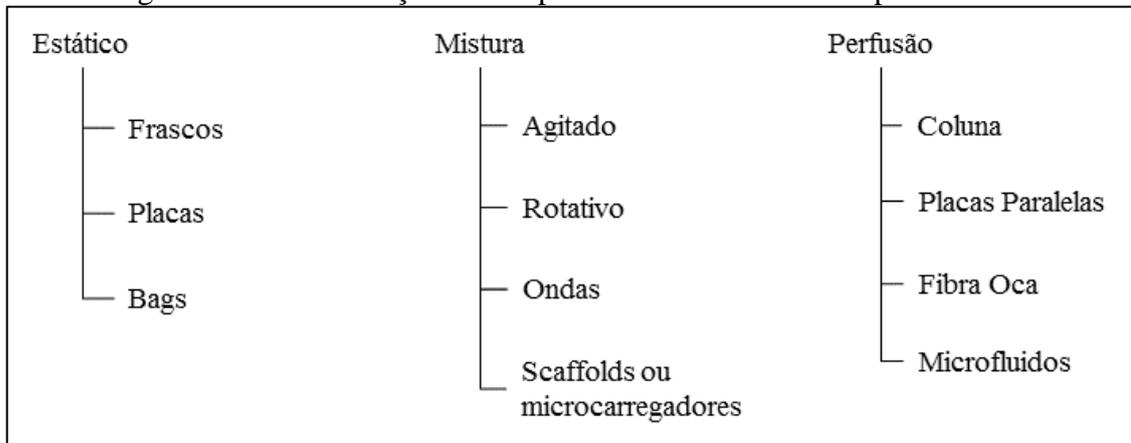
2.5 Biorreatores para cultivo de células

Os biorreatores podem ser definidos como equipamentos nos quais ocorrem processos biológicos ou bioquímicos em um ambiente onde há um estrito monitoramento e um preciso controle de operação e de parâmetros como pH, temperatura, pressão, suprimento de nutrientes e remoção de resíduos (MARTIN; VERMETTE, 2005).

Biorreatores podem ser utilizados para cultivo de células animais e construção de tecidos. Assim, pode-se explorar o efeito dos fatores bioquímicos e biomecânicos em seus desenvolvimentos. Há diversas dificuldades fundamentais relacionadas com a construção de tecidos tumorais e conseqüentemente com sua cultura *in vitro*. Para otimizar a solução destes problemas, projetos de biorreatores foram desenvolvido com esse intuito (GULLER et al., 2016).

Na Figura 14, é ilustrado os tipos de biorreatores que podem ser utilizados dependendo do tipo de cultivo. Para o caso de formação dos esferoides, os três tipos de biorreatores podem ser utilizados. Os biorreatores de cultivo estático e perfusão (microfluído) já foram abordados anteriormente, e o biorreator de mistura será melhor elaborado a seguir.

Figura 14 – Classificação dos dispositivos dos biorreatores para cultivo.



Fonte: GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008.

2.6 Biorreator de mistura

Nestes tipo de cultivo são realizados em biorreatores que contém um tanque com um elemento rotativo, um impelidor que têm a função de movimentar o meio de cultura através da formação de vórtices no fluido, proporcionando uma mistura dinâmica do meio e uma transferência de massa entre o meio e as células, tecidos ou matriz extracelular (GULLER et al., 2016). De forma geral, o princípio desse método é que uma quantidade de células são inseridas dentro do contêiner com meio, e devido a agitação mantido dentro do contêiner, as células são mantidas em suspensão (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Para a obtenção de esferoides tumorais, o biorreator spinner e o RWV são os mais mencionados (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015; BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; HICKMAN et al., 2014; SANTO et al., 2016). É também mencionado um novo biorreator versátil para a produção de esferoides que opera em regime laminar (MASSAI et al., 2016).

2.6.1 Biorreator spinner

Este tipo de biorreator (Figura 15) inclui um contêiner, local destinado para manter as células em suspensão junto com o meio, e um impelidor que é responsável em manter as células suspensas e o meio bem misturado, já que esse movimento do fluido auxilia no transporte de massa dos nutrientes e na diluição dos metabólitos dos esferoides (KIM, 2005). É possível trocar o meio do biorreator durante o cultivo, o que permite um longo tempo de cultivo para formação de esferoides (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Figura 15 – Foto do biorreator tipo spinner.



Fonte: Acervo pessoal.

Uma das desvantagens do uso deste biorreator é a força de cisalhamento na qual as células são expostas devido ao movimento do impelidor e este cisalhamento pode afetar a fisiológica celular (LIN; CHANG, 2008). Outra desvantagem é que o biorreator necessita de uma quantidade maior de meio de cultura (entre 100 a 300 mL em um biorreator de laboratório) quando comparado com os biorreatores estáticos (entre 15 e 20 mL). Vale lembrar que existem biorreatores mini-spinners, que utilizam um volume de 20 mL de meio de cultura (RODDAY et al., 2011). Outro problema em utilizar um biorreator de mistura é que corre uma alta distribuição de tamanho de esferoides formados, sendo necessário um processo posterior para separar os esferoides por tamanhos (LIN; CHANG, 2008). Outro problema envolve o teste com

drogas, no qual os esferoides devem ser coletados e dispostos em placas de poços, o que aumenta a manipulação envolvida (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Tabela 2 – Esferoides de linhagens obtidos em biorreator spinner.

Linhagem celular	Histologia	Nível de agitação (rpm)	Tempo de agregação (dia)	Forma de esferoide	Diâmetro médio (μm)
MCF7	Adenocarcinoma de mama de glândula mamária derivado do sítio metastático	80	1	Esférico	144 \pm 29
BT474	Carcinoma do ducto do peito da glândula mamária	80	1	Esférico	107 \pm 29
HCC1954	Glândula mamária/Carcinoma do ducto do peito	80-100	4	Esférico	149 \pm 32
HCC1806	Carcinoma escamoso mamário de mama grande	80-100	4	Irregular	238 \pm 41
A549	Alveolar carcinoma	40-60	3	Irregular	125 \pm 28
H460	Grandes células carcinoma do pulmão	40-60	3	Esférico	81 \pm 17
H157	Carcinoma escamoso oral	80-100	3	Irregular	141 \pm 21
H1650	Adenocarcinoma de pulmão derivado do sítio metastático	40-60	3	Esférico	100 \pm 22
HT29	Adenocarcinoma do colo retal	40-60	3	Esférico	292 \pm 92

Fonte: SANTO et al., 2016.

Este biorreator já foi utilizado para produzir esferoides de algumas linhagens de células tumorais. Para o cultivo de algumas células foram utilizados mais de uma velocidade de agitação, e em alguns casos, a forma dos esferoides não foi regular. A Tabela 2, apresenta os carcinomas e as linhagens celulares utilizadas, a agitação utilizada em cada linhagem, e os

resultados do tempo de agregação, da forma do esferoide e do diâmetro médio obtido (SANTO et al., 2016).

2.6.1.1 Resposta das células a turbulência e hidrodinâmica dos biorreatores

Os biorreatores, com o volume líquido maior que 25 mL, necessitam de agitação mecânica para que o meio de cultivo esteja homogeneizado. A principal função da agitação de um cultivo é manter a homogeneidade, minimizar as variações de O₂ dissolvido, as concentrações de nutrientes ou até mesmo a temperatura do meio no contêiner (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1986). A agitação pode ocorrer de diversas formas como um movimento vibratório do erlenmeyer (shaker), movimentos rotativos de impelidores, ou até mesmo por borbulhamento de gás. A combinação do movimento da agitação combinado com sólidos suspensos, como as células, origina uma fluidodinâmica complexa (CHERRY, 1993).

O movimento hidrodinâmico criado pela agitação pode alterar o metabolismo das células (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008). Diferente das bactérias e fungos, as células animais não possuem uma parede celular em volta da membrana, e por este motivo, as células animais estão expostas as forças hidrodinâmica do meio e logo sujeitas a danificação e morte (DUNLOP; NAMDEV, 1994). A tensão de cisalhamento pode, ainda, afetar a proliferação de algumas células como é o caso das células endoteliais (MARTIN; VERMETTE, 2005). As células que são cultivadas por agregação estão expostas a uma maior tensão cisalhante devido ao seu tamanho, como é ilustrado na Figura 16 (MARTIN, VERETTE, 2005).

A ligação célula-célula e células-matriz extracelular leva a formação de agregados. A hidrodinâmica de um biorreator pode interagir com os agregados de diversas maneiras. Uma delas é levar a formação de maiores agregados na colisão entre dois agregados, o que irá requerer uma maior agitação para manter o agregado suspenso. Alternativamente, a hidrodinâmica pode transferir células individuais a agregados. Por último, as forças hidrodinâmica podem levar a morte celular, destruindo a ligação célula-célula através da força do fluido ou de colisões (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1988).

A tolerância de uma linhagem particular a esses tipos de estresses, em um biorreator, depende de vários fatores como a magnitude das forças hidrodinâmicas locais produzidas por uma condição específica de agitação, a geometria do biorreator, o tempo de exposição ao cisalhamento e a geometria do agitador. (KRETZMER, 2002).

Uma teoria do motivo da danificação celular causada pela tensão de cisalhamento em biorreatores agitados é que a energia mecânica do agitador é transferida ao meio líquido na forma de tensão de cisalhamento. Toda essa tensão é dissipada através de

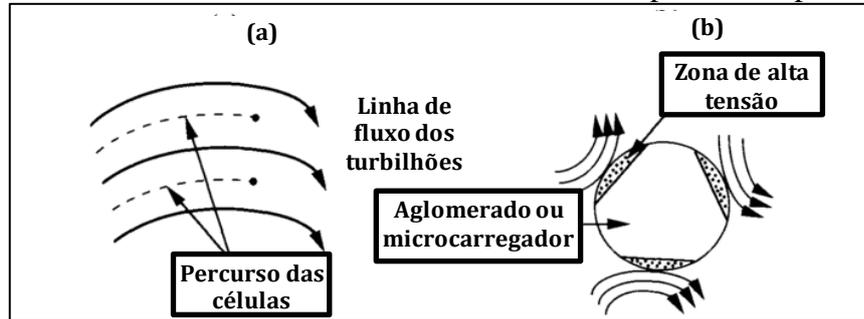
turbilhões em cascata, e esses turbilhões convertem essa energia mecânica em energia térmica às células. Essa dissipação de energia é responsável por homogeneizar o ambiente e melhorar a transferência do meio, mas gera uma grande tensão de cisalhamento para as células, principalmente às que estão localizadas próximas aos agitadores. Um reator em pequena escala contém 70% da dissipação de energia na região dos agitadores que representa aproximadamente 10% do volume do biorreator (MARKWAY et al., 2010; SHENKMAN et al., 2009).

A análise da mecânica dos fluidos de um biorreator sugere que há três potenciais mecanismos que danificam as células, sendo elas colisão de células ou microcarregadores com outras partículas, colisão das células com partes dos reatores (normalmente impelidores), e interação com turbilhões do tamanho ou menores que os microcarregadores.

A Figura 16 mostra o movimento do líquido em um reator do tipo spinner, no qual há picos de turbulência devido ao impelidor e a velocidade de agitação deste. Caso a menor turbulência for significativamente maior que o tamanho dos microcarregadores, as partículas se movem de acordo com o fluxo local Figura 16a. Neste caso, a velocidade não cria um nível de cisalhamento alto o suficiente para danificar as células (FRIEDLANDER, 1957; HINZE, 1971). Neste caso os turbilhões podem carregar grupos de microcarregadores sem causar grande velocidade entre elas (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1986).

Para turbilhões menores ou do mesmo tamanho do aglomerado ou do microcarregador, duas situações são possíveis. Se a interação dos turbilhões no aglomerado estiver no mesmo sentido rotacional, a partícula irá rotacionar neste sentido. Caso os turbilhões não estejam com o aglomerado no mesmo sentido de rotação, eles irão causar uma grande tensão de cisalhamento no aglomerado, como demonstrado na Figura 16(b). Essas forças cisalhantes são impossíveis de estimar devido à grande possibilidade de orientação dos turbilhões e devido à natureza transiente da interação (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1989).

Figura 16 – Interação entre o fluido do biorreator com os aglomerados (ou microcarregadores). (a) Células isoladas ou aglomerados (ou microcarregadores) pequenos são capturados por turbilhões maiores que eles e segue o movimento do fluido. (b) Quando diversos turbilhões com sentidos de rotação opostos interagem com aglomerados maiores que os turbilhões aumenta a tensão de cisalhamento na superfície da partícula.



Fonte: CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1986.

Foi demonstrado que o tamanho do menor turbilhão no sistema é melhor explicado como um correlator dos resultados que o fator de cisalhamento (CROUGHAN; HAMEL; WANG, 1987; HU, 1983; SINSKEY et al., 1981). Uma turbulência mais intensa resulta em turbilhões menores. Através da razão de tamanho de turbilhão por tamanho de partícula, foi verificado que valores em torno de um ou mais baixos, são os que mais danificam as células, ou seja, quanto menor o turbilhão e maior a célula, mais a células será cisalhada. Em outro trabalho foi evidenciado que em níveis de agitações baixas, a colisão partícula-partícula não foi um fator determinante para a velocidade de crescimento das células primárias de fibroblastos humano FS-4, mas este crescimento é influenciado em altas agitações (CROUGHAN; HAMEL; WANG, 1988).

Um dos métodos para diminuir a tensão de cisalhamento no biorreator é aumentar o volume de cultivo. Em um experimento feito com células de hibridoma, a velocidade de crescimento das células foi calculada em seis condições diferentes, variando o volume de cultura em três níveis, e a velocidade de agitação em dois níveis, como apresentado na Tabela 3. Neste experimento, os dois cultivos que apresentaram uma melhor velocidade de crescimento celular foram os que foram feitos em um maior volume de cultura. Isso ocorre pois o aumento do volume de cultura no biorreator, reduz a intensidade dos turbilhões (KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990).

Tabela 3 – Efeito do volume de meio no crescimento de células de hibridomas em um biorreator de 2 L.

Velocidade de rotação (rpm)	Volume (L)	μ_{app} (h^{-1})
200	1,0	$-0,0243 \pm 0,0175$
200	1,2	$-0,0575 \pm 0,0085$
200	1,7	$0,0469 \pm 0,0019$
220	1,2	$-0,0795 \pm 0,0082$
220	1,5	$0,0280 \pm 0,0034$
220	1,8	$0,0424 \pm 0,0025$

Fonte: KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990a

Assim como já relatado, quanto maior o nível de agitação, maior será a turbulência do biorreator e maior a chance de danificar as células. Em contrapartida, a medida que as células vão aderindo com outras células, há a formação de agregados. Esses agregados vão aumentando seus tamanhos com o tempo e devido a esse crescimento, será necessária uma maior agitação manter os aglomerados em suspensão, ao mesmo tempo que quanto maior o tamanho dos aglomerados, maior será o dano sofrido por eles pelos turbilhões formados. Os aglomerados porém tendem a ser mais resistentes (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013) e podem resistir a esses turbilhões menores. Porém, para contornar este problema, biorreatores com outras geometrias e outros princípios de misturas estão sendo desenvolvidos.

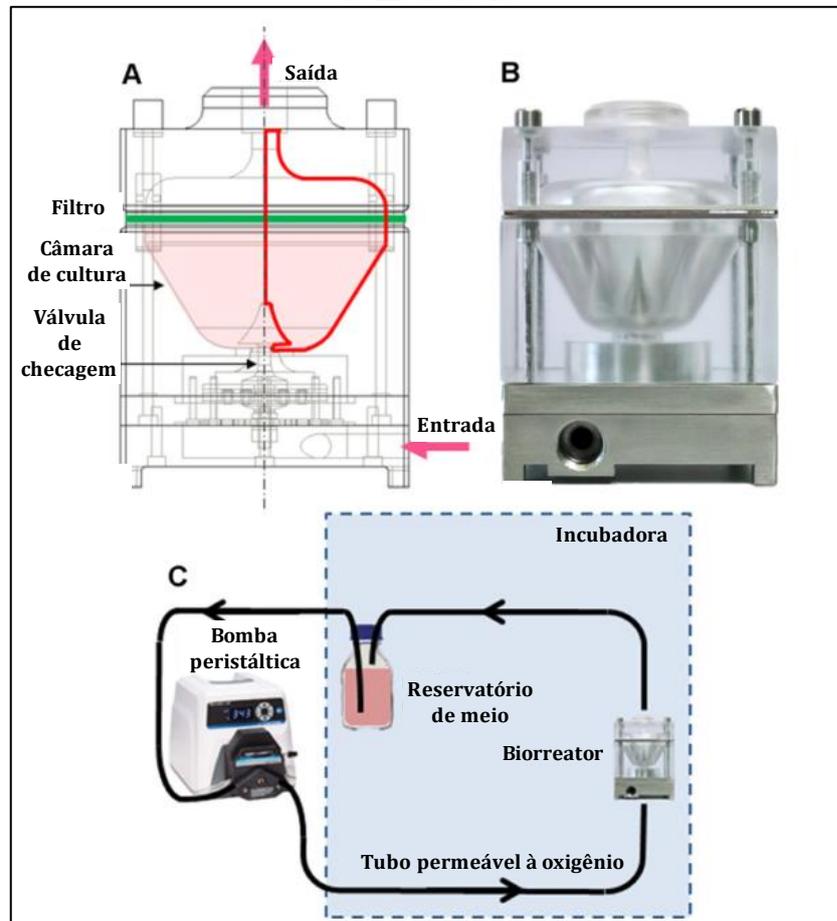
2.6.2 Biorreator de regime laminar

Este equipamento foi projetado pelo Departamento de Engenharia Mecânica e Aeroespacial Politecnico di Torino (Turim, Itália) e pelo Departamento de Medicina Clínica e Experimental, Università degli Studi di Parma (Parma, Itália) com o objetivo de manter a cultura celular em suspensão com uma transferência de massa adequada, e garantir que a tensão de cisalhamento no meio de cultura seja baixa o suficiente para não danificar as células durante o cultivo. O design do biorreator é ilustrado na Figura 17A. O volume interno deste biorreator é de 75 mL e uma foto do equipamento é representado na Figura 17B (MASSAI et al., 2016).

O biorreator faz parte de um circuito que é essencial para a oxigenação do meio (Figura 17C). O equipamento inteiro é composto por um reservatório de meio, um tubo de silicone permeável ao O_2 , uma bomba peristáltica, para um volume de trabalho total de 200 mL,

uma câmara de cultura (biorreator) e um filtro permeável ao meio, para prevenir a saída de células do biorreator (MASSAI et al., 2016).

Figura 17 – Esquema do biorreator (MASSAI et al., 2016). (A) Representação esquemática da câmara de cultura do biorreator, indicando os componentes internos e sua simetria axial (linhas vermelhas). (B) Foto do biorreator. (C) Representação esquemática do biorreator ligado ao circuito de circulação. O biorreator e o reservatório do meio são posicionados dentro da incubadora.



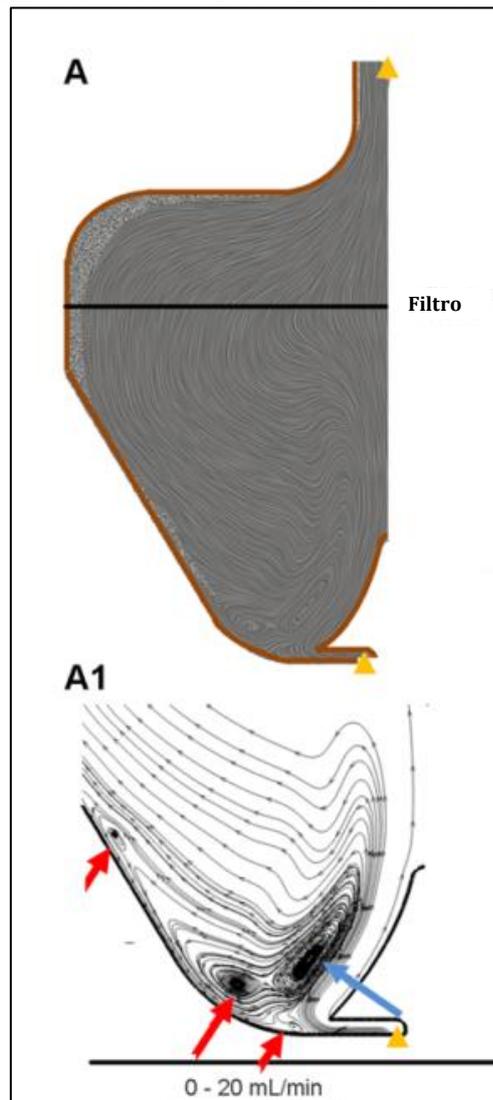
Fonte: MASSAI et al., 2016

O princípio funcional do equipamento é baseado na recirculação contínua do meio de cultura sobre regime laminar dentro do biorreator. O meio sai do reservatório e flui para dentro do biorreator através de uma válvula de retenção, auxiliado por uma bomba peristáltica. Sucessivamente, o meio passa através de um filtro, que impede a saída de células, e em seguida flui ao topo do biorreator, saindo deste e voltando ao reservatório de meio e este processo é repetido continuamente (MASSAI et al., 2016).

A Figura 18 representa simulações numéricas feitas com modelos computacionais para caracterizar o campo de escoamento dentro do biorreator, na vazão de escoamento de 20 mL/min. O equilíbrio entre as forças hidrodinâmicas e gravitacionais levam

a formação dos “vórtices flutuantes” localizados a uma certa distância da parede do biorreator (vórtices primários). Esses vórtices estão cercados por vórtices menores (vórtices secundários) localizados perto da parede, o que garante a suspensão da cultura celular e o acréscimo do transporte de massa (MASSAI et al., 2016).

Figura 18 – Campo de escoamento dentro do biorreator visualizado entre a interação mutual entre o meio e as células a em uma condição de baixa tensão de cisalhamento. A representação do campo de escoamento utilizando linhas de convolução integral linear é representado por A e a representação simplificada clássica por A1. As setas amarelas indicam a entrada e saída do fluxo, seta azul indica os “vórtices flutuantes primários” e as setas vermelhas as setas “vórtices flutuantes secundárias”

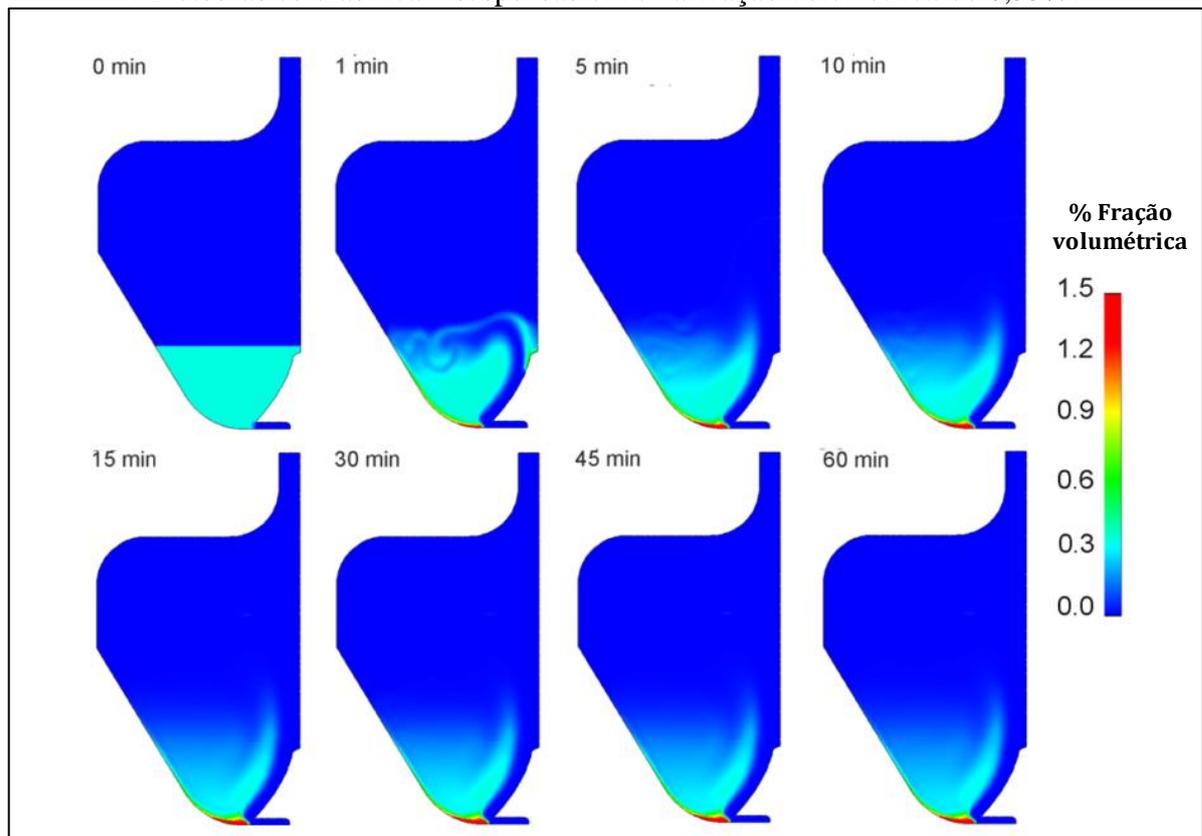


Fonte: MASSAI et al., 2016

A Figura 19 mostra o tempo de evolução da fração volumétrica ocupada pelas células suspensas dentro da câmara de cultura obtido através da simulação na presença de 9×10^6 de células inoculadas (fração volumétrica de 0,48 %) e impostas a vazão de 5 mL/min (condição

de baixa tensão de cisalhamento). Nota-se que as células se mantêm distribuídas relativamente de forma uniforme na base do biorreator. Passando 5 minutos, em torno de 95,3 % das células inoculadas estão suspensas em uma fração volumétrica de aproximadamente 0,33 %, o que é próximo do valor inicial de 0,48 % (MASSAI et al., 2016).

Figura 19 – Fração volumétrica ocupadas pelas células suspensas dentro da câmara de cultura em diferentes tempos. Observa-se que no início (0 min) as células estão em uma fração de 0,33. Assim que o processo é iniciado, o meio começa a circular no biorreator. Após 5 minutos as células ficam suspensas em uma fração volumétrica de 0,33%.



Fonte: MASSAI et al., 2016.

Em um teste com a linhagem celular de pulmão Calu-3 e houve formação de esferoides após 5 dias de cultura na vazão de 5 mL/min e foram obtidos esferoides desta linhagem no biorreator, com diâmetro de 250 μm , porém não houve retirada de amostras intermediárias (MASSAI et al., 2016).

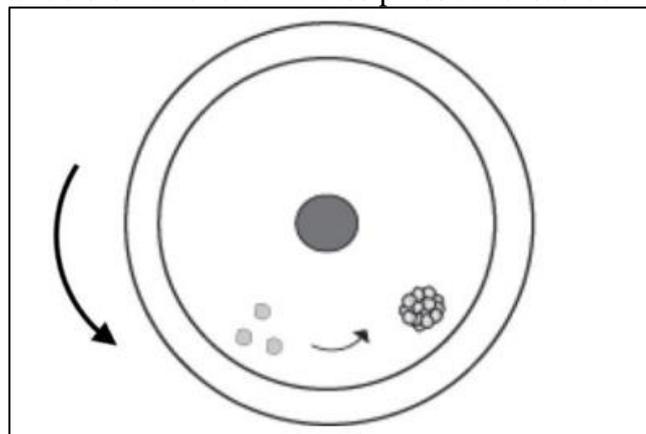
2.6.3 Biorreator de paredes rotatórias (RWV)

Biorreatores de paredes rotatórias funcionam de maneira similar ao biorreator spinner, porém ao invés de utilizar um impelidor para manter o meio em movimento e as células em suspensão, o contêiner no qual as células estão localizadas entra em movimento (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Este reator contém dois cilindros coaxiais, onde o meio e as células ficam

na região anular entre os dois cilindros e a homogeneização ocorre através do movimento rotacional da parede do reator (cilindro externo). A troca de gases é feita por uma membrana localizada no cilindro interno e as células são cultivadas na região anular entre os dois cilindros Figura 20. O RWV foi desenvolvido pela NASA em 1992, e foi designado para mimetizar a microgravidade e exercer baixa força de cisalhamento nas células. O constante movimento do biorreator previne a aderência das células na parede. A agitação também pode ser ajustada para otimizar o cultivo, podendo iniciar com agitações baixas, para quando as células estão na forma isoladas e aumentar quando as células começarem a aderir umas com as outras, já que quando estão aglomeradas é necessária uma maior agitação para mantê-las em suspensão devido ao ganho de massa.

A vantagem desse biorreator é a de fácil utilização devido metodologia simples, que permite grande produção em uma cultura 3D, e possibilita um longo tempo de cultura, já que é possível trocar o meio de cultura durante o cultivo (BARRILA et al., 2010; BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Figura 20 – Modelo do RWV. Este biorreator é composto de dois cilindros concêntricos e o cilindro externo gira, funcionando como um agitador. O movimento de rotação auxilia na aglomeração celular. A ausência de impelidores evita a colisão de células com este componente do biorreator e evita altos picos de tensão de cisalhamento



.Fonte: ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015

Alguns modelos 3D, incluindo linhagem celular e células primárias, já foram caracterizados utilizando o RWV. Um exemplo é uma linhagem celular de rim de filhote de hamster (SCHWARZ; GOODWIN; WOLF, 1992), linhagem de células epiteliais intestinais embrionária humanas (NICKERSON et al., 2001), adenocarcinoma de cólon humano (WARREN et al., 2009) (CARVALHO et al., 2005) e células tonsilar (amígdala) humana (DURAY et al., 2005). A concentração celular final obtida com a expansão de células de rim de filhote de hamster foi de $1,1 \times 10^7$ células/mL.

2.6.4 Biorreator de vórtices de Taylor (BVT)

Na engenharia de tecidos, diversos biorreatores são utilizados para o crescimento de células tanto comercialmente como em laboratório de pesquisa (BROWN, 2000). O biorreator spinner é um dos mais comuns e usados, porém, o movimento de agitação que o impelidor magnético gera no meio não é uniforme (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1986). Um biorreator com um controle do ambiente hidrodinâmico é o ideal para o cultivo de células animais e dos biorreatores disponíveis atualmente, o RWV é o que tem melhor controle do ambiente hidrodinâmico (SAINI; WICK, 2003).

Como já foi mencionado, o RWV é composto de um par de cilindros concêntricos no qual o cilindro externo exerce o movimento de rotação. O meio de cultivo é colocado na região anular entre os dois cilindros (UNSWORTH; LELKES, 1998). Alternativamente, o BVT consiste em um par cilindros coaxiais, no qual o cilindro interno realiza um movimento rotacional enquanto que o cilindro externo normalmente se mantém estático. O meio de cultura também se localiza na região anular entre os cilindros. A diferença entre esses dois modelos de biorreatores está no regime do escoamento do fluido.

Em 1687, Newton foi o primeiro a apresentar o escoamento hidrodinâmico em cilindro concêntricos e o primeiro equipamento desenvolvido com base neste sistema foi o viscosímetro em 1888, por Mallock. A partir desta data, um avanço nos estudos do comportamento de fluidos de fluxo laminar foi estudado por Couette em 1890. Atualmente, este regime é conhecido como fluxo laminar de Couette. Uma teoria fundamental da hidrodinâmica foi desenvolvida de fluidos viscosos por Taylor em 1923. Nessa teoria Taylor determinou as velocidades de rotação crítica do cilindro interno para permitir vórtices sem escoamento axial. Esse escoamento é conhecido como vórtice de Taylor (MA, 2003; MOORE, 1994).

No biorreator Couette-Taylor há uma maior variedade de regime de fluidos, além do fluxo laminar de Couette, onde dependendo do regime de escoamento do fluido, há uma melhora significativa no transporte de massa, (DESMET; VERELST; BARON, 1996; HAUT et al., 2003; WRÓNSKI et al., 1999). Porém, quanto maior o efeito do transporte de massa, maior será a tensão de cisalhamento no qual as células suspensas ficarão expostas, necessitando avaliar os efeitos e a viabilidade do regime em uso. Nesse biorreator, podem ser obtidos um número discreto de regimes hidrodinâmicos (ANDERECK; LIU; SWINNEY, 1986). Quando operado em sistema contínuo, um escoamento axial no espaço anular pode ser adicionado ao sistema, que é conhecido como escoamento de Taylor-Couette-Poiseuille (TCP) (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; RESENDE et al., 2001).

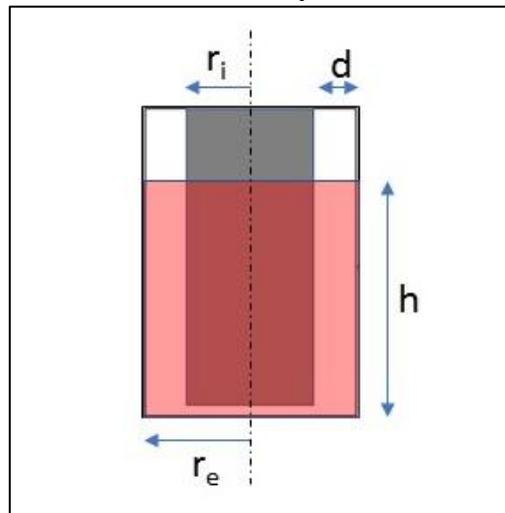
A possibilidade de se obter diversos tipos de regimes de escoamento, do laminar ao turbulento, e com diferentes tipos de regimes intermediários, a alta escalabilidade e o bom controle hidrodinâmico demonstra o grande potencial deste biorreator, podendo alcançar o desempenho esperado para uma grande variedade de aplicações em sistemas com reações químicas e bioquímicas (RESENDE et al., 2001) Algumas aplicações foram estudadas e bons resultados foram obtidos, se comparar esse tipo de biorreator com o frasco shaker (JANES; THOMAS; CALLOW, 1987).

2.6.4.1 Escoamentos no BVT

O regime do escoamento, para a geometria de biorreator da Figura 21 com as dimensões da Tabela 4, é caracterizado através do adimensional número de Taylor (Ta) que é definido pela Equação 1 (equação válida para a razão de aspecto, Γ , acima de 20) (CURRAN; BLACK, 2004). O número de Taylor tem o mesmo significado que o número de Reynolds, que representa adimensionalmente a razão do movimento rotacional pelas forças viscosas (SINEVIC; KUBOI; NIENOW, 1986), porém o número de Taylor geralmente se refere a um movimento circular.

$$Ta = \frac{\Omega_i \cdot r_i \cdot d}{\nu} \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{0.5} \quad \text{Equação 1}$$

Figura 21 – Geometria do BVT. Para que os vórtices se formem, é necessário que o cilindro interno de raio r_i rotacione.



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 4 – Dimensões do BVT utilizado por CURRAN; BLACK, 2004.

r_i (m)	0,0125
r_e (m)	0,0135
$d = r_e - r_i$	0,001
h (m)	0,035
$\Gamma = \frac{h}{d}$	35

Fonte: CURRAN; BLACK, 2004

O regime se encontra no fluxo laminar de Couette quando o número de Taylor é menor que o valor crítico de Taylor, Ta_{crit} , que especificamente para o biorreator com as dimensões da Tabela 4, tem o valor de 41,3. Neste regime, o movimento do fluido é apenas na direção tangencial, não havendo movimento na direção radial ou axial. A Figura 22(a) ilustra o fluxo laminar de Couette.

Uma equação mais geral do número de Taylor é descrita na Equação 2, que é válida uma maior variedade de geometria de biorreatores (MOORE, 1994).

$$Ta = \frac{\Omega \cdot d \cdot r}{\nu} \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right) \cdot \left(\frac{1}{F_g}\right) \quad \text{Equação 2}$$

O valor F_g é um fator de correção e pode ser calculado pela Equação 3.

$$F_g = \frac{\pi^2}{41,2} \cdot \left(1 - \frac{d}{2r_i}\right)^{-1} \cdot P^{-0,5} \quad \text{Equação 3}$$

O valor de P é um parâmetro que pode ser calculado pela Equação 4.

$$P = 0,0571 \cdot \left(1 - 0,652 \frac{d}{r_i}\right) + 0,00056 \cdot \left(1 - 0,652 \frac{d}{r_i}\right)^{-1} \quad \text{Equação 4}$$

É interessante notar que o fator de correção F_g e o parâmetro dependem apenas da geometria do biorreator, e independe movimento do biorreator.

A primeira transição ocorre quando o número de Taylor ultrapassa o valor de Ta_{crit} , que é quando ocorre a formação estável de vórtices rotacionais como é ilustrado na Figura 22(b). Esse regime é chamado de vórtice de Taylor (CURRAN; BLACK, 2004). O Ta_{crit} pode ser calculado pela Equação 5.

$$Ta_{crit} = \frac{\pi^2}{\sqrt{P}} \quad \text{Equação 5}$$

Na segunda transição ocorre uma oscilação dos vórtices resultando no chamado fluxo de vórtice ondulado ou escoamento wavy Figura 22(c). O regime de escoamento wavy ocorre apenas para a geometria em que o espaço anular d é pequeno (MOORE, 1994) e para acontecer é necessário que a relação dos raios dos cilindros seja inferior a 1,4 (DESMET; VERELST; BARON, 1996).

O valor crítico de transição para regime de escoamento wavy ($Ta_{crit,wavy}$) depende muito tamanho da região anular. A Tabela 5 mostra diferentes valores de transição para o regime wavy em função da geometria do biorreator (MOORE, 1994). Como já mencionado anteriormente, para valores grandes de d , não há o regime wavy, e o regime de vórtices de Taylor se mantém estável até valores de Taylor de 4000 (DESMET; VERELST; BARON, 1996).

Tabela 5 – Valores de $Ta_{crit,wavy}$ em diferentes geometrias de biorreatores

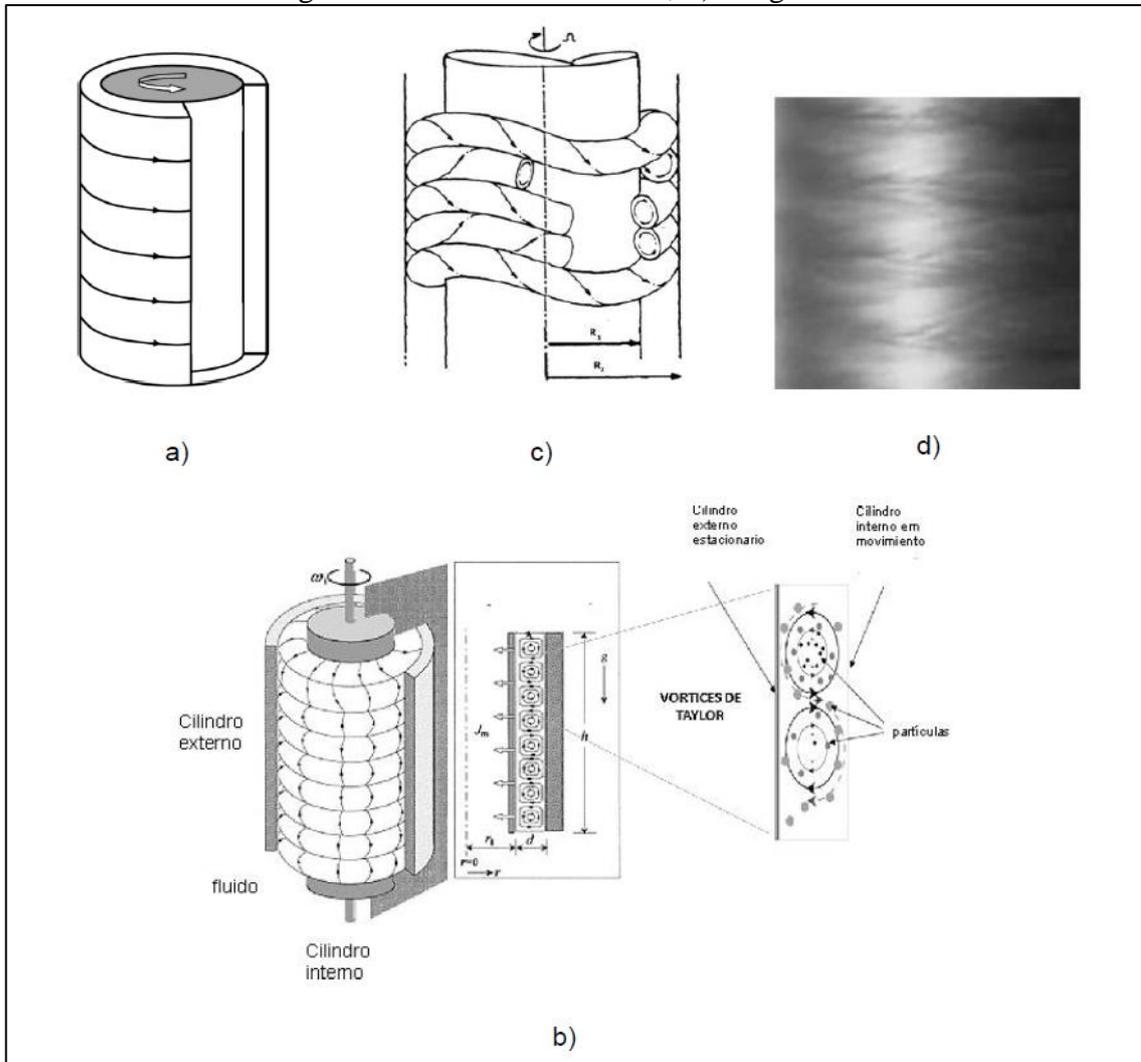
d/r_i	$Ta_{crit,wavy}$
0,05	$1,08Ta_{crit}$
1,00	$10Ta_{crit}$

O regime do fluido entra gradualmente no regime turbulento, Figura 22(d), quando o número de Taylor é maior que o valor crítico de transição para o regime turbulento Ta_{crit} . Esse regime é conhecido como fluxo turbulento de Taylor (DESMET; VERELST; BARON, 1996). Porém segundo alguns autores, não existe um critério definido de quando há a formação de vórtices. A Tabela 6 mostra os valores críticos de transição para o regime turbulento em função da geometria do biorreator (MOORE, 1994).

Tabela 6 - Valores de $Ta_{crit,turb}$ em diferentes geometrias de biorreatores

d/r_i	$Ta_{crit,turb}$
0,14	$10Ta_{crit}$
0,33	$500Ta_{crit}$

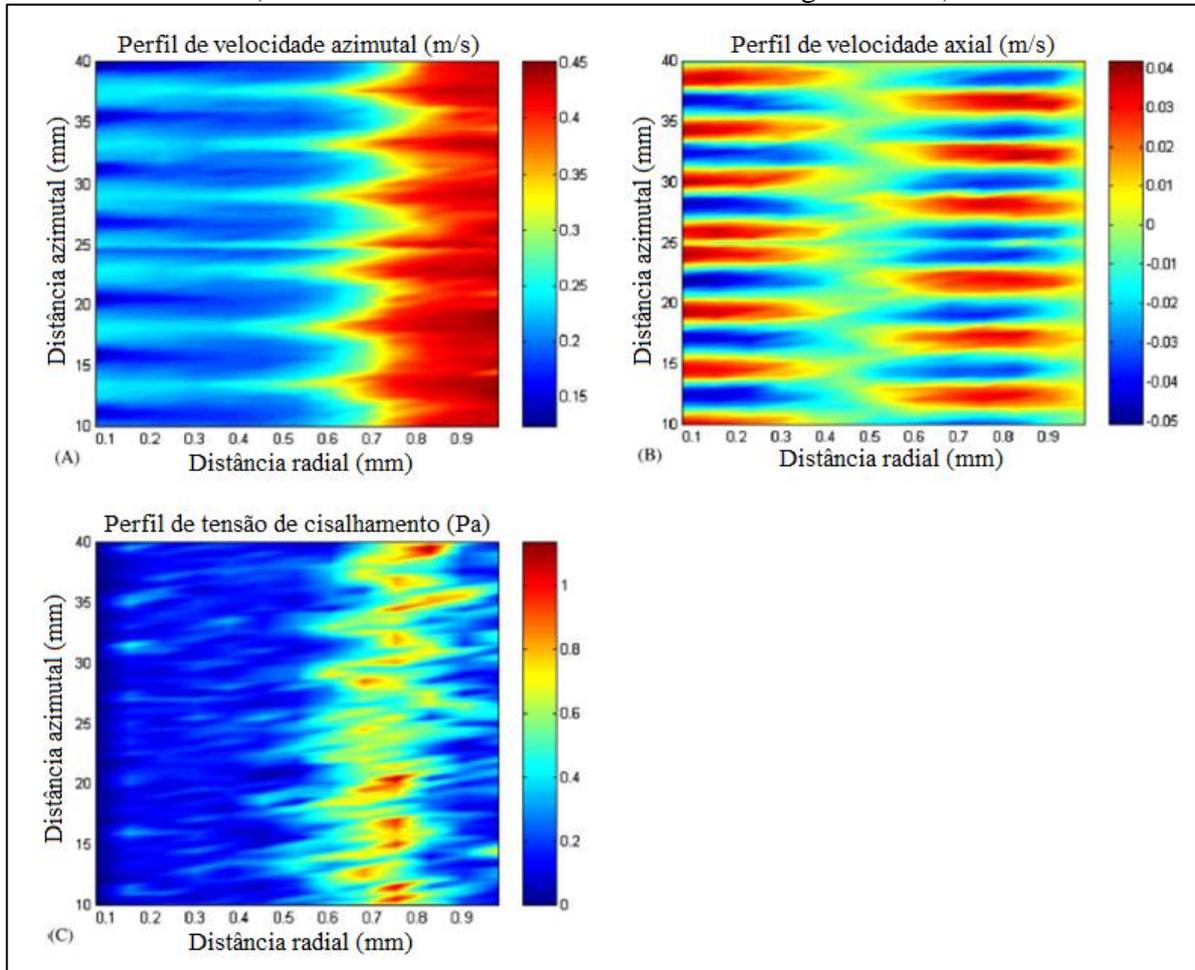
Figura 22 – Diferentes tipos de regime no BVT. Onde a) representa o regime laminar; b) o regime dos vórtices de Taylor onde pares de vórtices são formados sendo que cada um rotaciona em um sentido diferente; c) o regime wavy também forma pares de vórtices onde cada um gira em um sentido diferente; d) o regime turbulento



Fonte: adaptado de CURRAN; BLACK, (2004); FÉNOT et al., (2011); KYUN et al., (1999); OHMURA; SUEMASU; ASAMURA, (2005); TANZEGLOCK, (2008).

Foi mostrado a distribuição de velocidade e tensão de cisalhamento BVT para o número de Taylor 141,9 (regime wavy) utilizando a sonda óptica LDAE para o biorreator com a geometria apresentada na Tabela 4 e o resultado pode ser verificado na Figura 23, onde mostra que a estrutura do fluxo é bem ordenada com os vórtices claramente perceptíveis. Além disso, nesta mesma figura, nota-se que há regiões no biorreator onde há picos de alta velocidade, porém o as regiões onde há picos de tensão de cisalhamento são baixas (CURRAN; BLACK, 2004).

Figura 23 - Estrutura do vórtice de Taylor a um $Ta = 141,9$ (157,63 rpm), regime wavy, para um biorreator com $\Gamma=35$. Em (A) é possível notar que a velocidade do meio é maior perto do cilindro interno, o cilindro que se movimenta. Em (B) ilustra que a velocidade no centro do vórtice é baixa, e nas suas extremidades são onde ocorrem as maiores velocidades. Em (C) mostra que são poucas as regiões onde a tensão de cisalhamento é próxima de 1 Pa. (velocidade e tensão de cisalhamento na região anular)



Fonte: CURRAN, BLACK, 2004

Para o número de Taylor 43,2, no biorreator da Tabela 4, a tensão máxima é menor que 0,4 Pa e a viabilidade celular para as células testadas é de 80 % em 22 horas. Nessas condições, é possível manter as células em suspensão, ao contrário do regime de Couette, onde boa parte das células são sedimentadas (CURRAN; BLACK, 2004).

A linhagem celular imortalizada L929 (fibroblasto de rato) foi testada no biorreator com a geometria apresentada na Tabela 4 nos quatro regimes, laminar, vórtices de Taylor, wavy e turbulento. Após 7 horas de cultivo, mais de 95% das células em regime laminar sedimentam, no regime de vórtices de Taylor, em torno de 25% de células não se mantem em suspensão e nos regimes wavy e turbulento, 5% das células sedimentam. Considerando a viabilidade 22 horas após o cultivo, em torno de 80% das células eram viáveis no regime de

vórtices de Taylor, 50% no regime wavy e menos de 10% no turbulento. Para o regime laminar essa viabilidade foi testada após 7 horas de cultivo e em torno de 85% de células foram viáveis. Isso indica que para esta célula específica nesta geometria de biorreator, o regime de vórtices de Taylor é o que apresentou melhor resultado, pois conseguiu manter 80% das células vivas após um longo tempo de cultivo e com aproximadamente 80% das células se mantinham em suspensão (CURRAN; BLACK, 2004).

Neste tipo de biorreator, porém com outra geometria, foi possível cultivar a célula chinesa hamster ovary (CHO) (SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011). Apesar deste tipo de biorreator apresentar vantagens para cultivo de células animais e ser muito sugerido para esta finalidade, há poucas informações de cultivos feitos nele.

2.7 Modelagem de agregação de partículas suspensas

Uma maneira de se classificar partículas é através do seu tamanho. Tradicionalmente elas são distintas como partículas coloidais se forem menor que 1 μm e partículas suspensas se forem maiores que 1 μm (ELIMELECH et al., 1995).

O tamanho das partículas causa diferença de comportamento quando estas estão dispersas em líquidos. Um dos comportamentos é a velocidade de sedimentação das partículas, em que as partículas coloidais, tendem a se sedimentar lentamente enquanto que partículas suspensas tentem a se sedimentarem rapidamente em função da gravidade (ELIMELECH et al., 1995).

O processo de agregação de partículas suspensas é geralmente realizado em condições onde se possa manter as partículas em suspensão através de agitação do fluido. O transporte das partículas feitas através do movimento do fluido aumenta suas taxas colisões. Este processo de agregação é chamado de ortocinética (ELIMELECH et al., 1995).

A velocidade de redução da concentração das partículas é resultado de uma agregação ortocinética, onde no estágio inicial do processo as colisões ocorrem entre as partículas primárias. A equação diferencial de redução das concentrações das partículas é demonstrada na Equação 6 (ELIMELECH et al., 1995).

$$\frac{dn_T}{dt} = -\frac{16}{3}n_T^2Gr_1^3 \quad \text{Equação 6}$$

Na Equação 6, n_T representa a concentração total de partículas, G é a taxa de cisalhamento, t é o tempo e r_1 o raio da partícula primária. Nos estágios iniciais, n_T é o número

total de partículas primárias. Levando consideração que as partículas são esferas, a Equação 7 pode ser utilizada na Equação 6.

$$r_1^3 = \frac{3}{4} \cdot \frac{V_{part}}{\pi} \quad \text{Equação 7}$$

A fração volumétrica é definido na Equação 8.

$$\emptyset = n_T \cdot V_{part} \quad \text{Equação 8}$$

O termo \emptyset indica a fração volumétrica das partículas e V_{part} o volume da partícula. A Equação 9 é formada substituindo a Equação 7 e a Equação 8 na Equação 6.

$$\frac{dn_T}{dt} = - \frac{4 \cdot G \cdot \emptyset \cdot t \cdot n_T}{\pi} \quad \text{Equação 9}$$

Considerando a condição de contorno na qual no tempo de 0 horas a concentração de partículas iniciais são de n_0 , a equação pode ser utilizada na sua forma algébrica (Equação 10).

$$\frac{n_T}{n_0} = \exp\left(\frac{-4 \cdot G \cdot \emptyset \cdot t}{\pi}\right) \quad \text{Equação 10}$$

Esta equação indica que a concentração das partículas decresce exponencialmente com o tempo devido a agregação e que o tamanho médio do agregado de partícula n_T/n_0 aumenta exponencialmente. Para esta equação é considerado que o a fração volumétrica é constante, porém este não representa sempre o caso real (ELIMELECH et al., 1995).

2.8 Aumento da Viscosidade com adição de aditivos

Os aditivos são normalmente utilizados para ajudar o crescimento das células com fatores de crescimento ou fornecendo-lhes proteção. Em cultivo em suspensão em biorreatores, os aditivos protegem as células durante a interação com as bolhas ou com as forças de cisalhamento. A proteção pode ser através de mecanismo biológico, nos quais os aditivos alteram a habilidade das células a resistirem as tensões ou através de mecanismo físico, nos quais são feitas alterações nas propriedades físicas do meio de cultivo. Devido aos seus benefícios, aditivos químicos têm sido procurados e testados com a finalidade de proteger as células do ambiente nos quais elas estarão expostas (MICHAELS et al., 1991).

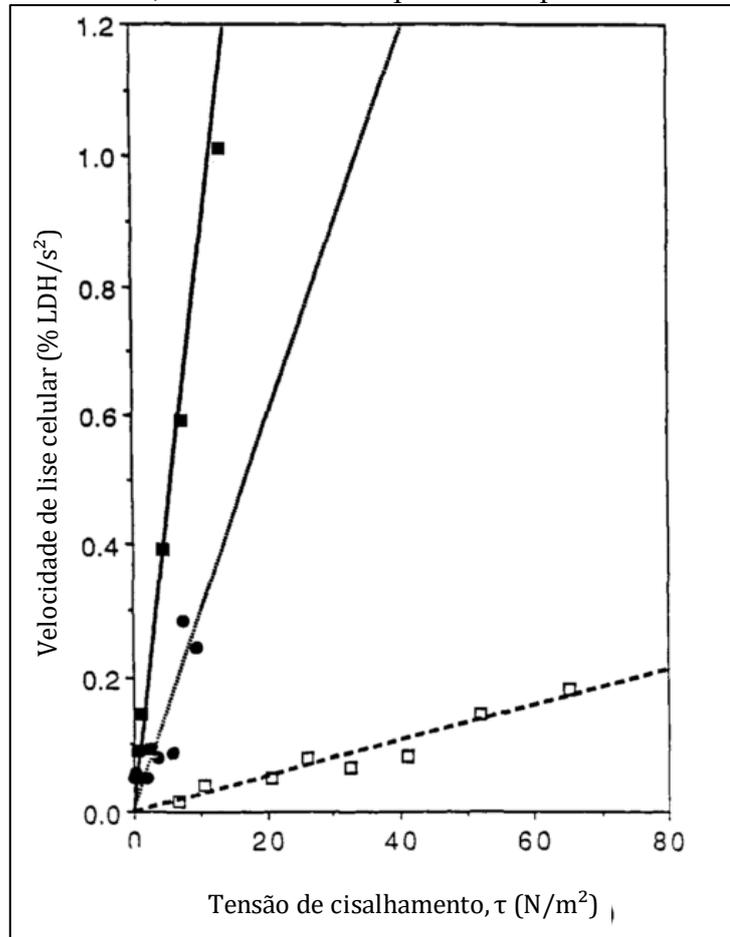
O uso de aditivos em cultivo de células tem sido bem estudado e têm se obtido um bom progresso no entendimento do efeito e mecanismo que eles apresentam na proteção das células em relação as forças hidrodinâmicas sofridas por elas em cultivos dinâmicos. Porém, é necessário entender melhor as alterações na questão dos aspectos mecânicos e fenomenológicos que os aditivos causam às células. Acredita-se que um estudo aprofundado irá produzir benefício necessário para avanço da tecnologia de cultivo celular (PAPOUTSAKIS, 1991).

O aditivo dextrana é adicionado ao meio de cultura para aumentar sua viscosidade. Ele já foi utilizado para o cultivo de hemácias em biorreator com o intuito de mantê-las no mesmo formato da corrente sanguínea durante o cultivo (FISCHER, 2007).

É sugerido que em cultivo estático há alteração na morfologia da célula de acordo com a viscosidade. Quanto maior a viscosidade, a matriz extracelular terá uma espessura menor. Outro fator indicado em cultivo estático é que a viscosidade irá alterar na difusividade de nutrientes para a célula (KHORSHID, 2005).

Na linhagem da célula de inseto SF-9 a dextrana com peso molecular 476K foi testada nas concentrações de 0,5% (w/v) e 4,5% (w/v) em conjunto com o meio TNM-FH. Nos dois casos, houve uma queda na velocidade de lise celular na presença da dextrana a maiores quando as tensões de cisalhamento eram maiores como pode ser verificado na Figura 24. Neste caso, o melhor resultado foi apresentado com a maior concentração de dextrana (GOLDBLUM et al., 1990).

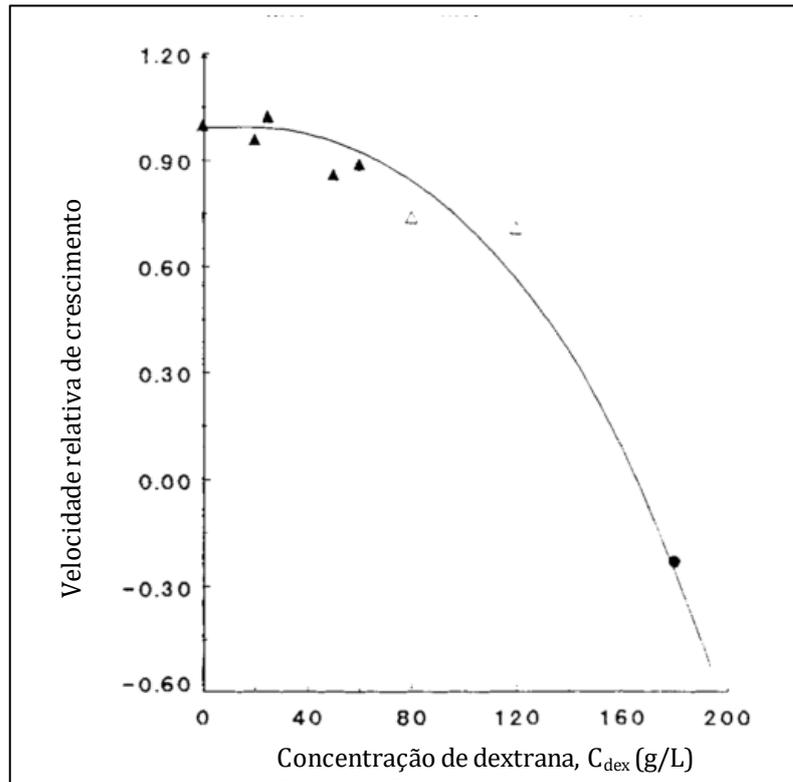
Figura 24 – Velocidade de lise celular em função da tensão de cisalhamento. Apresenta a velocidade de lise celular em função da tensão de cisalhamento nas células SF-9. O meio sem dextrana é representado por ■; meio com 0,5% de dextrana representado por ●; meio com 4,5% de dextrana representado por □.



Fonte: GOLDBLUM et al., 1990.

Foi investigado em uma linhagem de célula de fibroblasto FS-4 com o meio DMEM, adicionando 5% (v/v) de SFB (CROUGHAN; SAYRE; WANG, 1989), como a viscosidade pode afetar o crescimento e a velocidade de crescimento nas células. Neste teste foi mostrado que a concentrações de até 25 g/L de dextrana de 78.500 peso molecular, não tem efeito no crescimento das células e em uma concentração de 60 g/L, essa velocidade é reduzida 12%. Utilizando dextrana com peso molecular de 39.000, há uma diminuição de 25% de velocidade de crescimento e com um peso molecular de 9.000 ocorre morte das células. A Figura 25 representa o efeito do dextrana nesta linhagem celular (CROUGHAN; SAYRE; WANG, 1989).

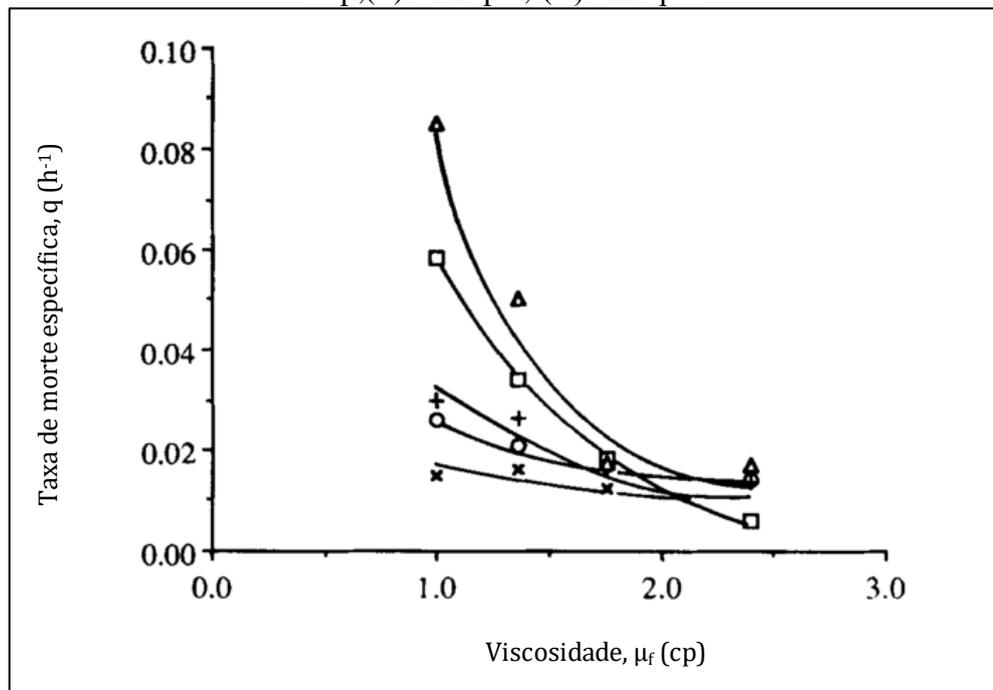
Figura 25 – Efeito da dextrana no crescimento da linhagem FS 4. O excesso de dextrana pode interferir na velocidade decrescimento das células.



Fonte: CROUGHAN; SAYRE; WANG, 1989.

Em um biorreator spinner, foi cultivado uma linhagem de célula BEK (*Bovine embryonic kidney cell*). Na Figura 26 mostra que a morte celular é menor à medida que a viscosidade do meio aumenta e que essa diferença é maior quanto maior é o nível de agitação do biorreator (LAKHOTIA; PAPOUTSAKIS, 1992). O efeito de proteção das células é maior quando há um alto nível de agitação.

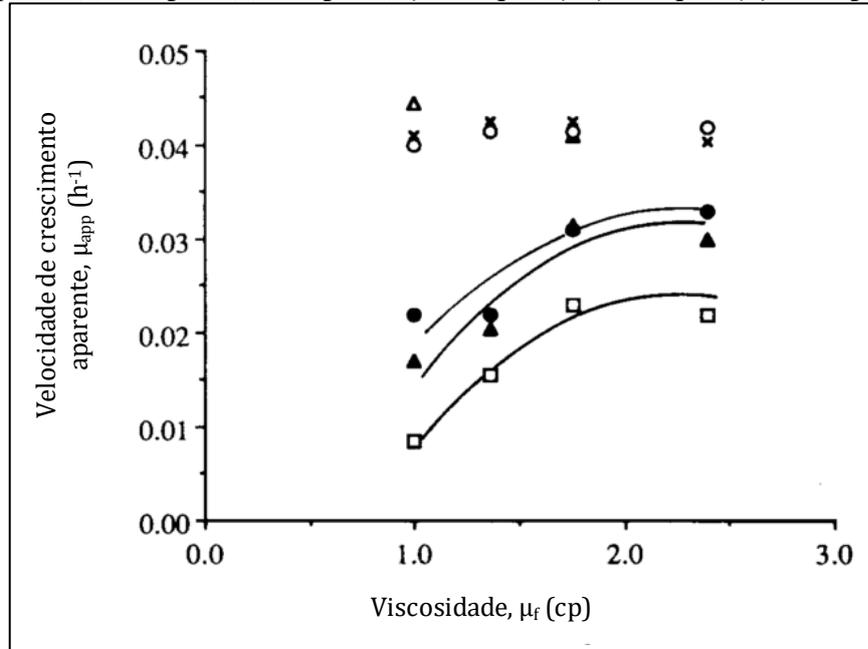
Figura 26 – Taxa de morte específica das células BEK de acordo com a viscosidade do meio em um biorreator spinner a diferentes níveis de agitação. (x) 100 rpm; (o) 120 rpm; (+) 140 rpm; (□) 150 rpm; (Δ) 160 rpm.



Fonte: LAKHOTIA; PAPOUTSAKIS, 1992

Na Figura 27, nota-se um aumento no crescimento celular à medida que a viscosidade do meio aumenta quando a velocidade de rotação do biorreator é acima de 100 rpm. Abaixo desta rotação, não há muita variação de velocidade de crescimento de acordo com a viscosidade, ou seja, o efeito de proteção da dextrana é maior quanto maior a rotação (LAKHOTIA; PAPOUTSAKIS, 1992). No entanto, a Figura 27 também mostra que a melhor condição não é necessariamente acima de 100 rpm.

Figura 27 – Velocidade de crescimento celular das células BEK em um biorreator spinner de acordo com o nível de agitação e a viscosidade do meio. (Δ) Cultura estática em placas de petri; (x) 45 rpm; (o) 90 rpm; (\bullet) 120 rpm; (\blacktriangle) 140 rpm; (\square) 160 rpm.



Fonte: LAKHOTIA; PAPOUTSAKIS, 1992.

2.9 Consideração Finais

O interesse pelo desenvolvimento do cultivo de células cancerígenas 3D vem crescendo devido à necessidade de um modelo adequado para a realização dos testes de drogas anticancerígenas.

O BVT é um bom candidato para a produzir esses esferoides pois apresenta tensões de cisalhamento baixas e uniformemente distribuídas. SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011 demonstraram a possibilidade de utilizar este biorreator para cultivo de células animais. Não foi encontrado na literatura nenhum uso deste biorreator para o cultivo de esferoides tumorais. Não há muita informação tecnológica sobre o BVT situação que gera a necessidade de levantamento de dados que permitam uma melhor avaliação sobre o potencial deste biorreator no cultivo de esferoides tumorais 3D.

Como não há muitas informações de cultivos de agregados 3D em biorreatores, também não há muitas informações sobre sua modelagem matemática. ELIMELECH et al., 1995 propôs modelos matemáticos para aglomeração de partículas de suspensão em um fluido com agitação. Devido ao seu tamanho, as células RT4 podem ser consideradas partículas de suspensão pois seu tamanho ultrapassa o valor de 1 μm .

Embora existam estudos mostrando os benefícios de proteção da célula da injúria mecânica causada pela agitação mediante o uso de aditivos que modificam a viscosidade do

meio de cultura, não há na bibliografia informações de como a viscosidade do meio pode influenciar a agregação celular para produção de esferoides no cultivo de células tumorais.

Devido a essas carências de informações é necessário obter informações que permitam melhorar a eficiência de produção em larga escala de esferoides de células tumorais para melhorar a eficiência e confiabilidade dos testes de novos medicamentos assim como tentar obter modelos matemáticos que prevejam seu comportamento de agregação durante o cultivo.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral:

Identificar condições de cultivo que conduzam a produção de esferoides da linhagem celular RT4 num biorreator de vórtices de Taylor que preencham requisitos mínimos de quantidade de aproximadamente 1000 esf/mL, tamanho de aproximadamente 400 μm e boa esfericidade.

Os objetivos específicos são:

1 – Quantificar a influência da agitação no tamanho do agregado e na viabilidade celular;

2 – Quantificar a influência da viscosidade do meio com adição de dextrana visando menor injúria e maior agregação celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 A linhagem celular

Foi utilizada a linhagem da célula RT4 de tumor de bexiga que é um modelo não invasivo. Esta linhagem foi fornecida pela equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela professora Priscyla Daniely Marceto Gaspari.

Para conservar as células RT4, foi preparado um meio de congelamento com uma composição de 90% de SFB e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO 99,85% extra puro, Across Organics, New Jersey, EUA), filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore, Alemanha).

4.2 Meios de cultura

O meio de cultura foi o meio McCoy's 5A com L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA). Na preparação do meio houve suplementação com 10% v/v de SFB (Hyclone, EUA) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃ Cultilab, Brasil). A esterilização do meio de cultura é feita por filtração em membrana de resina de 0,22 µm (milipore).

Na Tabela 7, está representada a composição para a preparação de 1 litro de meio.

Tabela 7 – Composição do meio de cultura McCoy's 5A utilizado nos cultivos da linhagem RT4 para a preparação de 1 litro de meio.

Componentes	Quantidade	Fabricante
McCoy's 5A	11,9 g (1 frasco)	Sigma-Aldrich, EUA
SFB	100 mL	HyCLone, EUA
NaHCO ₃	2,2 g	Cultilab, Brasil
Água ultrapura tipo I	900 mL	Millipore, Alemanha

Fonte: Acervo pessoal.

Para preparar meio com uma viscosidade maior, foi adicionado dextrana em uma parte do meio já preparado (aproximadamente 150 mL). A quantidade de dextrana adicionada dependia da viscosidade desejada no experimento (vide Apêndice).

A esterilização do meio de cultura é feita por filtração em membrana de resina com diâmetro de poro de 0,22 µm (Millipore, Alemanha).

4.3 Frasco de Cultura

Para expandir as células em cultivos estáticos para preparo do inóculo do cultivo da RT4 no BVT foram utilizados frascos de cultura celular, também conhecidos como frascos T (Corning, EUA), com área superficial de 25 e 75 cm² de poliestireno com tratamento para adesão.

4.4 Biorreator de vórtice de Taylor

O biorreator era composto por um corpo de vidro de borossilicato com volume aproximado de 500 mL e dois braços laterais, um deles utilizado para a retirada de amostra e outro com a finalidade de realizar trocas gasosas, uma tampa superior e uma tampa em cada braço todas constituídas de Teflon, um cilindro interno com esqueleto de Teflon recoberto por uma membrana fina de silicone e suspenso numa haste de vidro que funcionava como eixo. O motivo da haste ser de vidro era para utilizar um material que em contato com o Teflon da tampa do biorreator tivesse um fator de atrito baixo, facilitando a rotação do cilindro interno. Na Figura 28 pode-se visualizar o formato do biorreator utilizado no experimento e na Tabela 8 as dimensões geométricas do mesmo.

Este biorreator é um modelo exclusivo do LATECC, Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celulares do Departamento de Engenharia Química da UFSCar e está atualmente sendo estudado para formação de agregados das células RT4 e para o cultivo das células hMSC (células estromal mesenquimal humana). A Equação 1 para o cálculo do número de Taylor não é válida para este biorreator pois Γ é menor que 20. Para calcular o número de Taylor neste biorreator utilizou-se a Equação 2.

Figura 28 – Biorreator de vórtices de Taylor utilizados nos experimentos de cultivo neste trabalho



Fonte: Acervo pessoal.

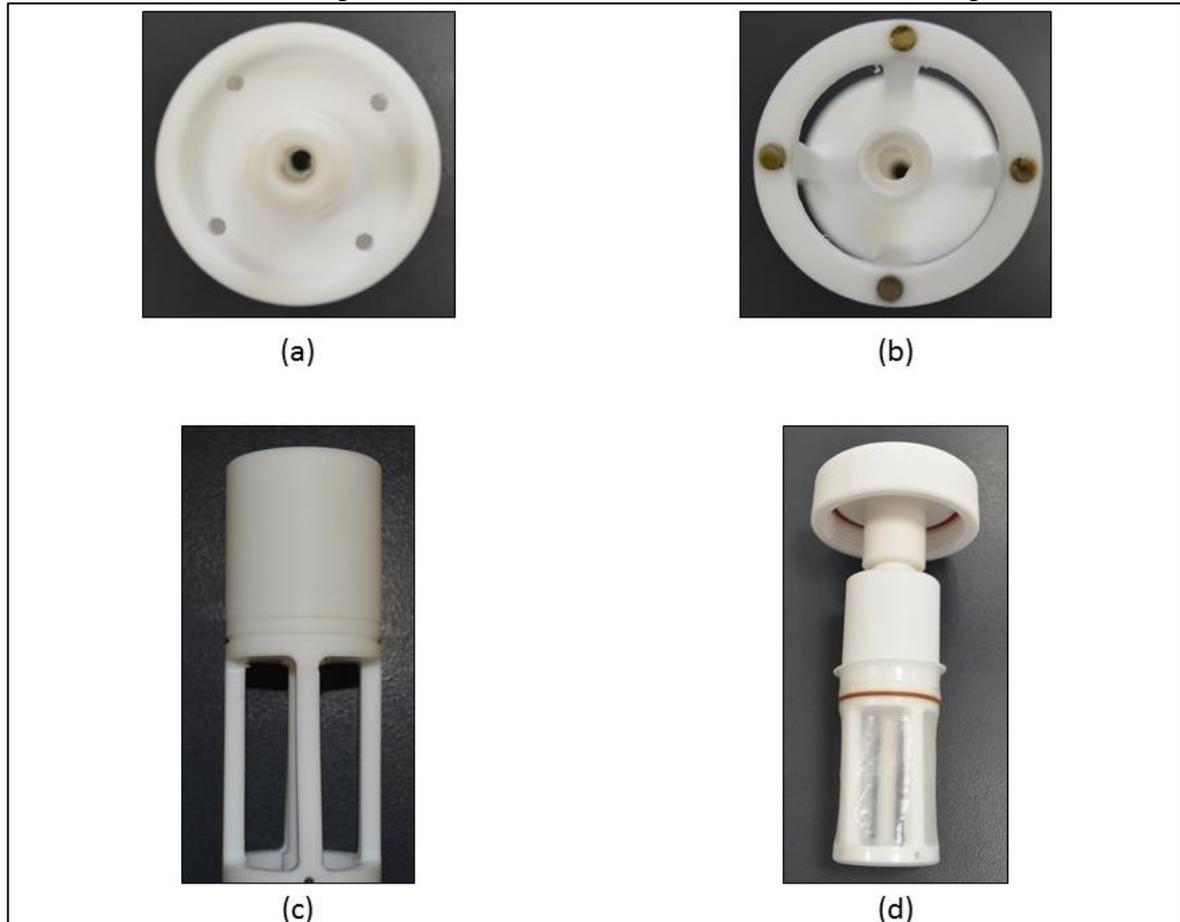
Na Figura 29 pode-se observar o design do agitador. Na parte inferior do agitador (Figura 29-a) há quatro ímãs distribuídos simetricamente para garantir a rotação uniforme do cilindro interno através de um agitador magnético. Na parte superior do esqueleto (Figura 29-b), observa-se quatro furos que auxiliam na distribuição de gases (O_2 , nitrogênio e CO_2), diminuindo a espessura da camada limite formada na parede interna da membrana de silicone ao serem liberados no espaço “de cabeça” entre a tampa do biorreator e a superfície de meio de cultura. Na parte frontal do agitador, observa-se o esqueleto de Teflon do agitador (Figura 29-c). Durante o cultivo, o esqueleto de Teflon é envolvido com uma membrana de silicone (Figura 29-d).

Tabela 8 – Dimensões características do biorreator de vórtices de Taylor

DIMENSÕES	VALOR
Raio interno do cilindro externo (r_{ext})	32,6 mm
Raio externo do cilindro interno ($r_{int} = Di/2$ + espessura da membrana de silicone)	21,8 mm
Altura do agitador	720 mm
Altura do líquido, h	60 mm
Espessura da membrana de silicone	0,218 mm
Espaço anular ($d = r_{ext} - R_{int}$)	10,7 mm
Volume do biorreator	500 mL
Volume de trabalho	100 mL
CARACTERÍSTICAS GEOMÉTRICAS	
Razão entre raios $\sigma = \frac{r_{int}}{r_{ext}}$	0,671
Razão de aspecto $\Gamma = \frac{h}{d}$	5,60

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 29 – Detalhamento do cilindro interno de Teflon do BVT, com a) a face inferior com quatro ímãs, b) a face superior com quatro furos para saída gases, c) o perfil lateral do cilindro e em d) o mesmo perfil lateral com a membrana de silicone e a tampa do biorreator.

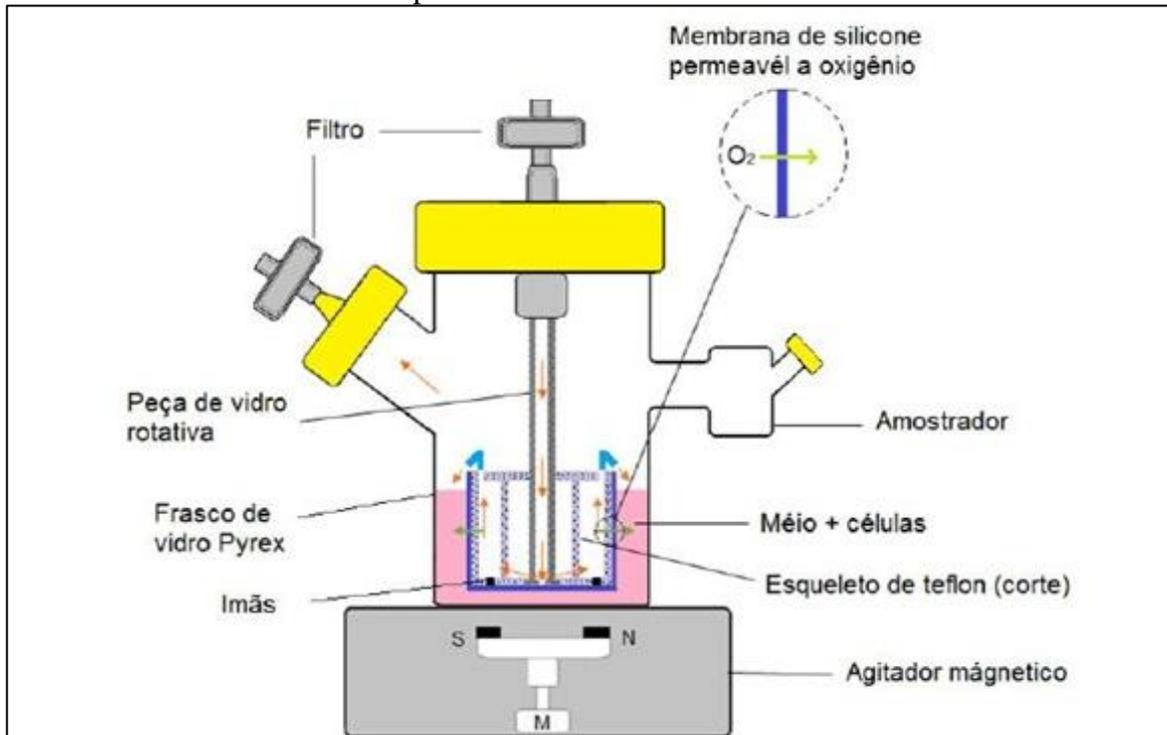


Fonte: Acervo pessoal.

O polímero (Momentive Performance Materials, EUA) utilizado na membrana que envolve o agitador é formado por metiltriacetoxissilano, octametilciclotetrasiloxano e diacetil di-tert-butoxy silano. A transferência de O_2 através da membrana ocorre por difusão sem formação de bolhas de ar no meio de cultivo.

Na Figura 30, esquematiza-se o funcionamento do BVT, detalhando a transferência de O_2 pela membrana de silicone, o percurso do ar, o local de retirada da amostra, a espaço anular onde se localiza o meio de cultura e o cilindro interno que gira acionado pelo agitador magnético.

Figura 30 – Esquema do biorreator Couette-Taylor e seus componentes principais e o processo de funcionamento.



Fonte: GIL, 2015

Para a geometria do biorreator utilizado, os valores do parâmetro P , o fator de correção F_g e o valor crítico de Taylor foram calculados pelas Equação 3, Equação 4 e Equação 5 respectivamente. Os resultados estão na tabela a seguir.

Tabela 9 – Valores do parâmetro, fator de correção e número crítico de Taylor para o biorreator utilizado nos experimentos

P	0,0397
F_g	1,59
T_acrit	49,53

Fonte: Acervo pessoal.

Os valores de Taylor foram calculados quatro diferentes condições de cultivo, nas velocidades de rotação de 90 e 110 rpm e nas viscosidades de 0,80 e 1,65 cP. Esses valores estão na Tabela 10 calculados pela Equação 2.

Tabela 10 – Valores de Ta para todas as condições de cultivo utilizada

	0,80 cP	1,65 cP
90 rpm	1204,669	584,08
110 rpm	1272,374	713,87

Fonte: Acervo pessoal.

Pela geometria do biorreator, a razão entre os raios é maior que 1,4, portanto não há regime wavy. Considerando que o valor de Taylor crítico para o regime turbulento é 100 vezes maior que o número Ta_{crit} , nenhum dos valores apresentados na Tabela 10 é maior que 4953. Todos os experimentos foram realizados no regime de vórtices de Taylor, pois os Ta calculados estão todos acima do Ta_{crit} e abaixo do $Ta_{crit,turb}$.

4.5 Preservação Celular

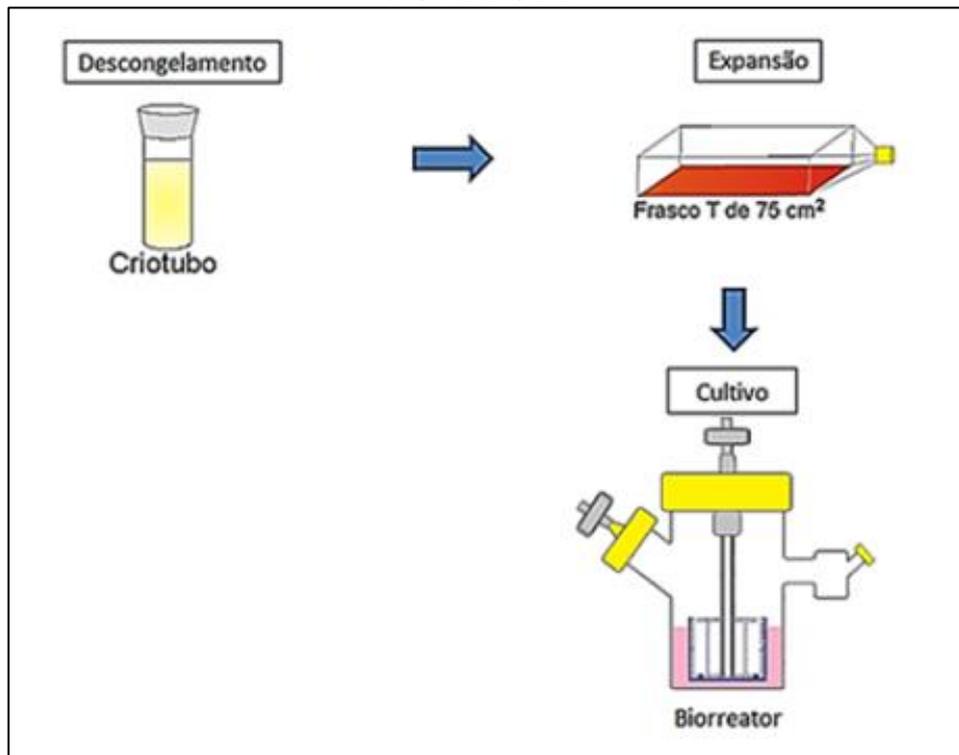
Para armazenamento e preservação das células RT4, as células foram retiradas do cultivo na fase exponencial e centrifugadas a força de 400,6g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em volume de meio de congelamento de forma que a concentração celular fosse de 1×10^6 células/mL.

O meio de congelamento era composto de uma proporção de 1:9 de DMSO e SFB. A seguir, as células foram transferidas para vários criotubos, e estes foram colocados em um recipiente contendo isopropanol e mantidas por um dia em freezer em uma temperatura aproximada de -80 °C. Passado o tempo, os tubos eram transferidos para um reservatório contendo nitrogênio líquido na temperatura de -196 °C.

4.6 Procedimento Padrão dos cultivos estáticos e dos cultivos em biorreator

Na Figura 31 é esquematizado o procedimento genérico para a realização de experimentos com a linhagem RT4 no BVT.

Figura 31 – Procedimento seguido para realização do cultivo para a formação de agregados das células RT4.



Fonte: GIL, 2015.

Duas metodologias de agregação foram testadas após inocular as células no biorreator. Uma metodologia foi agitação constante, na qual após a inoculação de células o nível de agitação era mantido constante, e outra metodologia foi feito com agitação intermitente, agitação por cinco minutos, seguido de um intervalo de duas em duas horas em repouso, para auxiliar a agregação celular. Passados seis horas nesse ciclo, a agitação do biorreator era fixada num valor constante.

4.6.1 Ativação de linhagem celular RT4

O primeiro passo para ativação da linhagem celular RT4 foi descongelar um tubo criogênico que contenha as células e imediatamente colocar o tubo no banho termostático a 37 °C até o descongelamento total do meio e células. Em um ambiente estéril, 1 mL de células contidas no tubo criogênico eram transferidas para um Falcon, já com 9 mL de meio de cultivo, obtendo assim um volume total de 10 mL. O Falcon era levado para a centrífuga (Excelsa Baby I, modelo 206, FANEM, Brasil) e operado a 400,6g por 5 minutos. O sobrenadante que continha meio de congelamento era retirado e descartado, e as células eram ressuspensas, ainda no falcon, em 5 mL de meio de cultivo e transferidas para um frasco T de 25 cm². O frasco era levado para a incubadora (Thermo Forma, EUA) na temperatura de 37 °C e com 5% de CO₂.

Todos os procedimentos que envolviam manipulação asséptica foram realizados em Câmara de fluxo laminar Sterilgard III advance, classe II, da Baker Company, EUA, modelo SG403/SG603.

4.6.2 Procedimento de preparo do inoculo em frasco T

Para atingir a concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL no BVT, são necessários, no mínimo, dois frascos T de 75 cm². Após preparar o inóculo nos frascos, retirava-se com uma pipeta o meio de cultivo, fazia-se uma lavagem com 10 mL de PBS (Solução tampão de fosfato), com pH ajustado entre 7,2 e 7,4 e retirava-se o excesso de meio e células mortas. Em seguida, adicionava-se 4 mL de solução de enzima de dissociação celular Tryple 10X (GIBCO), para desaderir as células da superfície dos frascos T. As garrafas são colocadas na incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por 15 minutos. Passado esse tempo, adicionava-se 6 mL de meio de cultivo em cada garrafa para interromper a ação enzimática. As células eram transferidas para Falcons, centrifugadas por 5 minutos a 400,6g na centrifuga (Excelsa Baby I, modelo 2065, FANEM, Brasil). O sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em 5 mL de meio de cultivo era filtrado em uma peneira de nylon com uma abertura de 100 µm (BD Falcon, Cell Strainer, 100 µm, EUA) para garantir que a maioria das células inoculadas no biorreator estivessem isoladas ou em pequenos aglomerados. Dessa suspensão retirava-se uma alíquota para contagem de células no hemacitômetro.

Tabela 11 – Composição de 1L da solução PBS utilizada para a retirada de células mortas e excesso de meio no frasco T

Componente	Quantidade
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Água ultrapura tipo I	1000 mL

Fonte: Acervo pessoal.

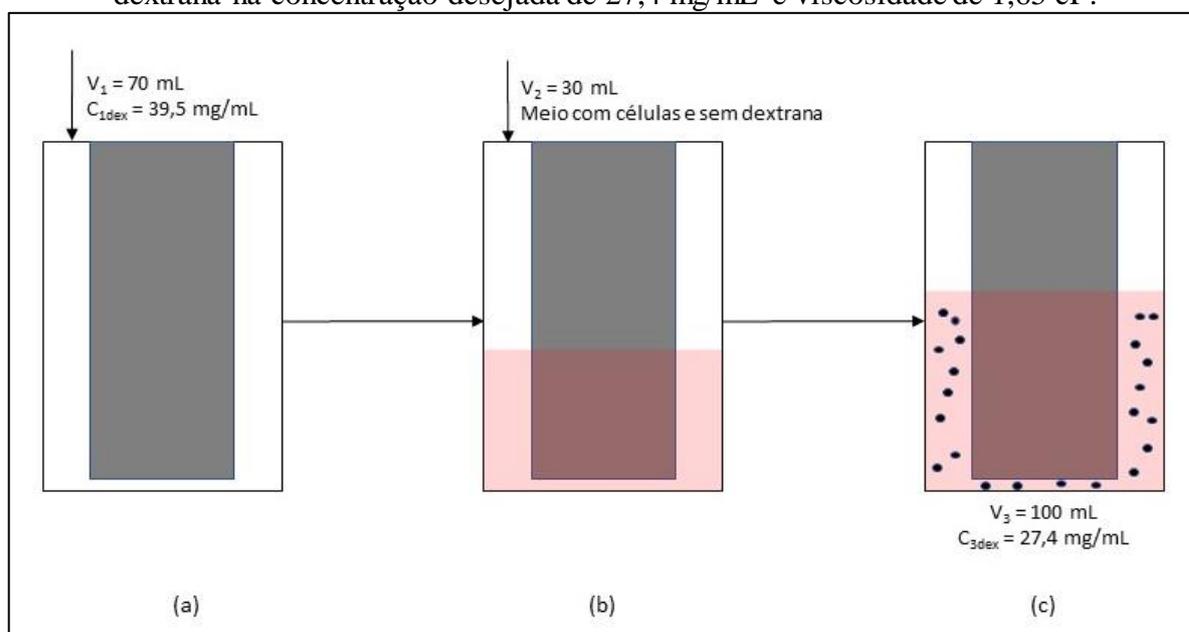
4.6.3 Preparação dos biorreatores

Após o procedimento anterior, era realizado a inoculação no BVT. Antes da inoculação, porém, os biorreatores foram preparados recobrimdo-os com uma fina camada de

Sigmacote® (Sigma-Aldrich, EUA), solução heptanólica de organosiloxano clorado, que era utilizada para evita adesão de células à superfície do vidro. O heptano era evaporado normalmente à temperatura ambiente, e em seguida o BVT era enxaguado com água destilada e secado. Depois da secagem, o biorreator era autoclavado a 120 °C por uma hora para eliminar qualquer contaminação com microorganismos. Depois de autoclavado adicionava-se 70 mL de meio ao biorreator e a seguir, era colocado na incubadora de CO₂ por aproximadamente 24 horas antes da inoculação, para controle de pH.

Quando o meio tem em sua composição o aditivo dextrana, era necessário que prepara-lo com uma concentração acima da desejada, pois inicialmente colocou-se 70 mL de meio isento de células no biorreator e posteriormente o volume era completado até 100 mL com meio com células e sem dextrana. O procedimento adotado é ilustrado na Figura 32. No caso, como a viscosidade de meio desejada é de 1,65 cP (o dobro do meio sem dextrana), a concentração de dextrana que o meio deveria ter para esta viscosidade é de 27,4 mg/mL. Com a diluição da dextrana ao inocular as células, o volume previamente adicionado ao biorreator deveria estar com uma concentração maior que 27,4.

Figura 32 – Procedimento de diluição da dextrana para se obter no final uma viscosidade de 1,65 cP. (a) Biorreator vazio onde era adicionado o meio com dextrana concentrada acima do nível desejado. (b) Biorreator com meio com dextrana na concentração de 39,5 mg/mL prestes a ser inoculado com células e meio isentos de dextrana. (c) Biorreator com células e meio com dextrana na concentração desejada de 27,4 mg/mL e viscosidade de 1,65 cP.



Fonte: Acervo pessoal.

4.6.4 Condições de cultivos e metodologia de agitação

Para o cultivo da célula RT4 no BVT, duas metodologias foram testadas modificando duas variáveis em dois níveis cada (dois planejamentos fatoriais 2^2). Nas duas metodologias, as variáveis modificadas foram a velocidade de agitação e a viscosidade do meio.

Os níveis de velocidade de agitação testados foram de 90 rpm e 110 rpm e os níveis de viscosidade escolhida foram de 0,80 cP e 1,65 cP. Os níveis de agitação foram escolhidos baseado no fato de que nestas velocidades as células ficam em suspensão no biorreator, e também para verificar o quanto a viscosidade pode proteger as células em uma condição de alta agitação. Já os níveis de viscosidade foram baseados em um meio sem o aditivo dextrana, 0,80 cP, e em um meio onde a viscosidade seja aproximadamente duas vezes maior que o meio sem o aditivo, que foi a viscosidade de 1,65 cP.

Um dos métodos de agitação (intermitente) foi utilizado para auxiliar na fase de agregação das células. Neste método, após a inoculação de células, a agitação do BVT era acionada por 5 minutos e desligada pelos próximos 115 minutos. Este ciclo era repetido mais três vezes (por 6 horas) e após esse período, a agitação era mantida constante até o final do cultivo. Neste método, a aglomeração inicial ocorria por agrupamento, quando não havia agitação, e por colisão na presença de agitação. Essa metodologia foi baseada pelo método adotado por HUNT et al (2014).

O outro método utilizado já foi utilizado para obtenção de esferoides de células tumorais em biorreatores spinner (SANTO et al., 2016), e consiste na agitação contínua e constante, ou seja, a agitação era mantida constante durante todo cultivo. Neste método, a aglomeração das células ocorre por colisão.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Análise de viabilidade e densidade celular

A contagem das células era realizada com uma solução aquosa de azul de tripan 0,4% (v/v) (GIBCO, EUA) para determinar a densidade e a viabilidade celular por meio da câmara de Neubauer com auxílio do microscópio BX51 (Olympus, Japão). O corante permite a contagem diferencial de células vivas e mortas na câmara (NG; BERRY; BUTLER, 1996). As células mortas ficavam permeáveis ao corante, adquirindo cor azulada, enquanto que as células vivas não permitiam a entrada do corante e mantinham sua cor original.

4.7.2 Medição do tamanho de agregados e Esfericidade durante o cultivo

As medições dos tamanhos dos aglomerados e sua Esfericidade das células foram feitas com auxílio do software ImageJ 1.51 (Instituto Nacional da Saúde, EUA), auxiliado pela câmara de Neubauer e pelo microscópio BX51 (Olympus, Japão). Pela câmara de Neubauer tem-se a referência de tamanho, já que um quadrante dele mede 1 mm.

O ImageJ analisa e calcula o diâmetro e esfericidade tomando como base uma medida de referência, que pode ser obtida através da câmara de Neubauer. O programa analisa a partícula através do contraste de tons cinza do aglomerado de células e o fundo da imagem, sendo este contraste ajustável. No exemplo da Figura 33, a área vermelha será o que o programa considerará como partícula e os valores fornecidos será em referência a área vermelha. Esta área pode ser ajustada de acordo do contraste do agregado com o contraste do agregado e o fundo da câmara.

O diâmetro foi calculado assumindo que o esferoide era uma circunferência e foi calculado pela Equação 11.

$$d_m = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}} \quad \text{Equação 11}$$

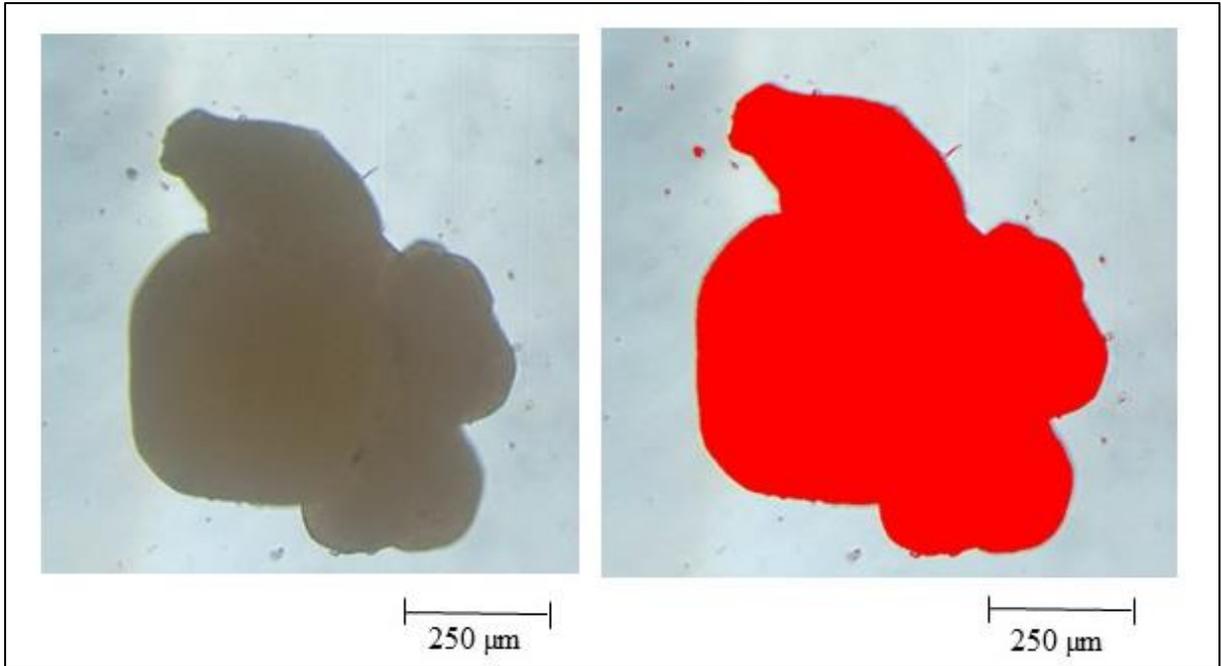
Onde: d_m = diâmetro médio da amostra analisada; μm e A = área do esferoide; μm^2 .

O programa utiliza a Equação 12 para calcular a esfericidade.

$$Esf = 4 \cdot \pi \cdot \frac{A}{[DM]^2} \quad \text{Equação 12}$$

Onde DM é o maior diâmetro do esferoide.

Figura 33 – Análise da partícula por contraste utilizando o software ImageJ 1.51. A área vermelha seria a região que o programa utilizara para fazer as medições. O contraste pode ser ajustável, ou seja, pode-se selecionar área de toda partícula desde que o contraste esteja adequado.



Fonte: Acervo pessoal.

A quantidade de esferoides medidos foi a quantidade de esferoides que haviam em um volume de 100 μL . Essa quantidade de amostra era colocada na câmara de Neubauer para a medição dos esferoides. Portanto em cada amostra de experimento havia uma quantidade diferente de esferoides.

4.7.3 Volume médio dos esferoides e fração volumétrica

O volume médio era calculado assumindo que os agregados estão no formato esférico utilizando o diâmetro médio ImageJ. A fórmula utilizada no cálculo segue pela Equação 13.

$$V_M = \frac{\pi \cdot d_m^3}{6} \quad \text{Equação 13}$$

A fração volumétrica foi calculada pela Equação 14.

$$\phi = V_M \cdot C_E + V_X \cdot C_X \quad \text{Equação 14}$$

Onde C_E é a concentração de esferoides no volume de meio do biorreator e V_X é o volume médio da célula.

4.7.4 Velocidade específica de aglomeração

A velocidade de aglomeração foi estimada segundo a modelagem de aglomeração de partículas apresentada na Equação 10.

$$\frac{n_T}{n_0} = \exp\left(\frac{-4 \cdot G \cdot \Phi \cdot t}{\pi}\right) \quad \text{Equação 10}$$

A Equação 15 representa a definição da velocidade de agregação neste trabalho e a Equação 16 mostra a forma logarítmica da Equação 10.

$$k_{ag} = \frac{4G\Phi}{\pi} \quad \text{Equação 15}$$

$$\ln(n_T) = k_{ag} \cdot t + \ln(n_0) \quad \text{Equação 16}$$

Nesta equação o valor de n_0 foi considerado igual ao C_{X0} (Equação 17), pois no instante inicial as únicas partículas presentes no biorreator são as partículas primárias, que são as células livres, e o valor de n_T , que representa o número de partículas totais no biorreator (esferoides e células), foi calculado pontualmente seguindo a Equação 18 (ELIMELECH et al, 1995).

$$n_0 = C_{X0} \quad \text{Equação 17}$$

$$n_T = C_E + C_X \quad \text{Equação 18}$$

4.7.5 Quantificação do número de esferoides

O número de esferoides no biorreator foi obtido utilizando uma placa de poço. Em um poço, coloca-se um volume de 100 μL de amostra retirada do biorreator e contava-se o número de esferoides no microscópio.

4.7.6 Efeito das variáveis independente nas respostas

Os efeitos que as variáveis independentes velocidade de agitação e viscosidade dinâmica podem causar nas variáveis respostas (diâmetro médio dos esferoides, concentração de esferoides e esfericidade) foram calculados pelas equações apresentadas por RODRIGUES et al, 2005.

As variáveis respostas, representadas por y_1 , y_2 , y_3 e y_4 , estão codificadas de acordo com as variáveis independentes, como pode ser verificado na Tabela 12 e foram codificadas desta maneira para demonstrar como foi realizado o cálculo do efeito.

Tabela 12 – Exemplo de tabela de variáveis independentes e variáveis respostas

Ω (rpm)	μ_f (cP)	
	0,80	1,65
90	y_1	y_2
110	y_3	y_4

Fonte: Acervo pessoal.

O efeito foi calculado como a diferença das médias marginais da velocidade de rotação e da viscosidade dinâmica. As Equação 19, Equação 20 e Equação 21 representaram respectivamente o efeito da velocidade de agitação na resposta ($\overline{y\Omega}$), o efeito da viscosidade dinâmica na resposta ($\overline{y\mu_f}$) e o efeito da interação das duas variáveis na resposta ($\overline{y\Omega\mu_f}$), no qual y foi representado por uma das respostas (diâmetro médio, concentração de esferoide e esfericidade).

$$\overline{y\Omega} = \frac{y_1 + y_2}{2} - \frac{y_3 + y_4}{2} \quad \text{Equação 19}$$

$$\overline{y\mu_f} = \frac{y_1 + y_3}{2} - \frac{y_2 + y_4}{2} \quad \text{Equação 20}$$

$$\overline{y\Omega\mu_f} = \frac{y_1 + y_4}{2} - \frac{y_2 + y_3}{2} \quad \text{Equação 21}$$

4.7.7 Otimização pela função desejabilidade

Para determinar os melhores parâmetros e metodologias, foi feito um cálculo com a combinação dos resultados do tamanho, da concentração de esferoides e esfericidade. Esta otimização foi calculada utilizando uma forma da função desejabilidade (CRISTIE DIEGO et al., 2015; WANG; WAN, 2009).

A função desejabilidade age de uma maneira similar com a função normalizar, no qual a resposta se move em direção ao alvo (CRISTIE DIEGO et al., 2015). Para sua utilização, normaliza-se as variáveis resposta em um vetor unitário, e quanto mais o módulo deste vetor for de 1, melhor será a resposta. A Equação 22 representou o vetor representativo da resposta do diâmetro médio dos esferoides.

$$ADM = 1 - \frac{|d_{ideal} - d_m|}{d_{ideal}} \quad \text{Equação 22}$$

Na Equação 22, ADM representou o vetor do diâmetro médio dos esferoides, e D_{ideal} foi o diâmetro desejado como resultado do cultivo, que foi de 400 μm .

$$ACE = 1 - \frac{C_{Eideal} - C_E}{C_{Eideal}} \quad \text{Equação 23}$$

Na Equação 23, ACE era o vetor da concentração de esferoides e C_{Eideal} era a concentração de esferoide desejada. No cultivo de esferoides realizado por SANTO et al., 2016, ele utilizou uma concentração inicial de 2×10^5 a 5×10^5 células/mL e obteve uma concentração de esferoides entre 1000 e 1500 esferoides/mL. Baseado nestes dados utilizou-se uma regressão linear e através da Equação 24 obtida nesta regressão, calculou-se o C_{Eideal} .

$$C_{Eideal} = 0,0017 \cdot C_{X0} + 666,67 \quad \text{Equação 24}$$

A esfericidade foi obtida pelo ImageJ, e seu valor ideal é 1 e o valor fornecido pelo programa representava um adimensional e pode ser considerada um vetor normal.

Passado este processo, calculou-se o valor dos efeitos, calculou-se o valor da desejabilidade por uma média geométrica apresentada na Equação 25.

$$FD = \sqrt[3]{ADM \cdot ACE \cdot ESF} \quad \text{Equação 25}$$

Onde FD representa a função desejabilidade, e quanto maior o seu valor, melhor será a combinação de resultados. Esses cálculos foram realizados em todos os pontos de todos os cultivos a partir das 20 horas, já que é a partir deste ponto no qual os agregados passa a ser esferoides. O maior valor de E representa a melhor combinação de resultados do cultivo.

4.7.8 Quantificação de glicose e lactato

A quantificação da glicose e lactato foram realizadas no analisador enzimático YSI Biochemical Analyser 7100 MBS, após a centrifugação da amostra em 400,6 g por 5 minutos para a retirada de células e esferoides, coletando apenas sobrenadante.

4.7.9 Quantificação de aminoácidos

As análises de aminoácidos foram feitas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando a metodologia proposta por Henrikson & Meredith, 1984.

Assim como nos aminoácidos, as amostras foram preparadas após a centrifugação em 400,6g por 5 minutos para a retirada de partículas, e alíquotas de 200 μL foram reservadas para a análise. As etapas de preparação de amostra incluíram sequencialmente filtração, secagem em temperatura ambiente, hidratação das amostras (solução preparada a

partir de etanol, água ultrapura tipo 1 e trietilamina), secagem em temperatura ambiente, derivatização das amostras (solução preparada a partir de água ultrapura tipo 1, trietilamina e PITC), secagem em temperatura ambiente, adição da solução diluente adequada para análise de aminoácidos livres, Pico-Tag Sample Diluent to Amino Acid analysis (Waters, IRL), e injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Waters, IRL).

O método cromatográfico utilizou fase estacionária constituída pela coluna pico-tag (Waters, IRL), fases móveis A: água ultrapura tipo 1, acetonitrila (Panreac, ESP) trietilamina (Sigma, GER) e acetato de sódio tri-hidratado (Synth, BRA) e fase móvel B: água ultrapura tipo 1 e acetonitrila (Panreac, ESP). Na pré-coluna de derivatização o PITC (Waters, IRL), conhecido como reagente de Edman, foi adicionado para realizar a degradação dos aminoácidos sequencialmente em amins primárias e secundárias em 254 nm à temperatura ambiente. Para quantificação dos aminoácidos foi utilizado o padrão de aminoácidos Waters e também foram preparadas manualmente curvas de calibração dos aminoácidos prolina (Sigma, GER), arginina (Sigma, GER), asparagina (Sigma, GER) e glutamina (Sigma, GER).

4.8 Cultivo no BVT

Os cultivos realizados, sua metodologia de agitação, velocidade de rotação (Ω) e viscosidade dinâmica (μ_f), são indicados na Tabela 13. Todos os cultivos foram realizados dentro de uma incubadora, a temperatura de 37 °C e uma concentração de CO₂ inicial de 15%.

Tabela 13 – Numeração dos cultivos e condições de operação.

Experimento	Metodologia de agitação	Ω (rpm)	μ_f (cP)
Int; 90; 0,80	Intermitente no início	90	0,80
Int; 90; 1,65	Intermitente no início	90	1,65
Int; 110; 0,80	Intermitente no início	110	0,80
Int; 110; 1,65	Intermitente no início	110	1,65
Cont; 90; 0,80	Contínuo	90	0,80
Cont; 90; 1,65	Contínuo	90	1,65
Cont; 110; 0,80	Contínuo	110	0,80
Cont; 110; 1,65	Contínuo	110	1,65

Fonte: Acervo pessoal.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito da dextrana em cultivo estático

Devido à pouca informação disponível na literatura e à pouca experiência existente no grupo LATECC com a temática de cultivo em agregados, inicialmente foram feitos três cultivos exploratórios em frasco T de 25 cm² utilizando concentrações 0, 40,0 e 70,4 mg/mL de dextrana. Nos três casos o inóculo foi de $6,90 \times 10^5$ células e o tempo de cultivo foi de 120 horas. Esse cultivo foi feito para verificar se a dextrana alterava a velocidade específica de crescimento das células e as condições do cultivo. Os resultados obtidos estão detalhados na Tabela 14.

Tabela 14 – Verificação das velocidades de crescimento das células para diferentes concentrações de dextrana.

$C_{dex}(mg/mL)$	μ_f (cP)	C_X 5 dias ($\times 10^6$ células)	μ (h ⁻¹)
0,00	0,80	5,38	0,0171
40,05	2,33	5,78	0,0177
70,39	5,30	5,18	0,0168

Fonte: Acervo pessoal.

A diferença nos valores da velocidade de crescimento das células em cultivo estático sem e com dextrana é baixo. Para os cultivos no biorreator, será utilizado uma concentração de 27,43 mg/mL de dextrana no meio para uma obter uma viscosidade de aproximadamente 1,65 cP, quase duas vezes mais viscoso que o meio sem dextrana a 37 °C.

5.2 Cultivos e formação de esferoides nos biorreatores

Em todos os cultivos, a concentração de células isoladas (C_X) diminui com o tempo de cultivo devido à formação de agregados celulares. Após 12 horas de cultivo, a concentração celular atingiu valores extremamente baixos.

Paralelamente, o diâmetro médio (d_M) e a concentração de esferoide (C_E) aumentam nas primeiras horas. O aumento do diâmetro está relacionado com a colisão das células para formar agregados. Com a agitação dentro dos biorreatores, as células isoladas eventualmente colidiam umas com as outras, e começavam a se agregar. Com o passar do tempo, os esferoides iam crescendo devido à agregação e a proliferação celular. Também

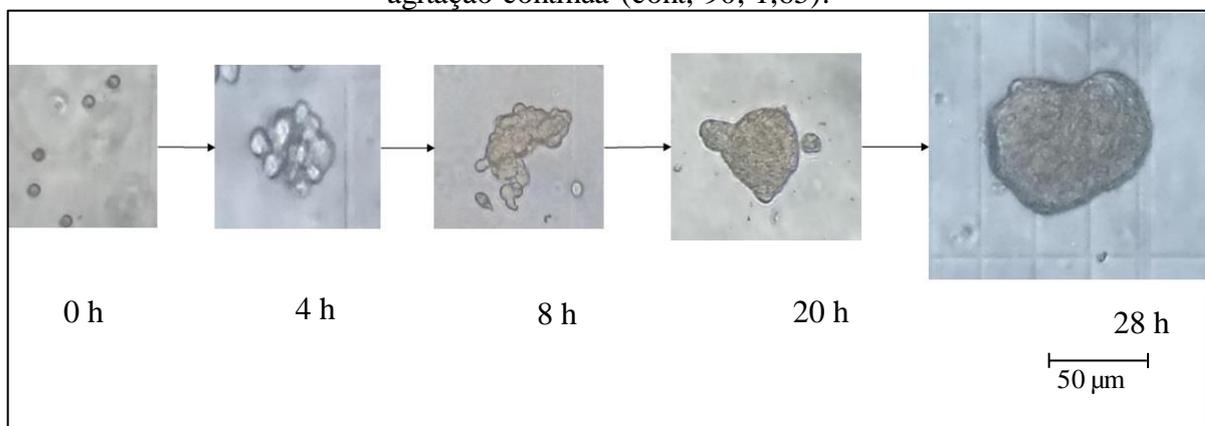
contribuía com esse crescimento a colisão dos esferoides com outras células livres e a colisão com outros esferoides (Figura 34). O processo de formação dos é ilustrado na Figura 35. Como os volumes médio (V_M) foram calculados a partir dos diâmetros médios, ambas grandezas seguem uma tendência de aumento durante os cultivos.

Figura 34 – Aglomeração de esferoides para a formação de um esferoide maior. O tempo em que isso que essa aglomeração começa a ocorrer pode variar de acordo com a condição de cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 35 – Aglomeração das células e crescimento dos esferoides dentro do biorreator com agitação contínua (cont; 90; 1,65).



Fonte: Acervo pessoal

Os esferoides cresciam até o momento em que eles atingiam um determinado volume, no qual a agitação não era forte o suficiente para mantê-los em suspensão. Quando os esferoides atingiam determinado volume, eles decantavam e permaneciam na base do biorreator, podendo se aglomerar com outros esferoides já decantados. A Figura 36 representa

a junção de dois grandes esferoides que depois de sedimentar ficaram no fundo do biorreator. A decantação dos esferoides acabou provocando uma queda do valor do diâmetro médio dos esferoides no biorreator, já que a amostragem foi realizada com as células em suspensão. Na Figura 37 ilustra-se os esferoides que não se mantiveram em suspensão no biorreator.

Figura 36 – Típica junção de dois grandes esferoides durante o cultivo das células RT4 no biorreator de Taylor.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 37 – Esferoides que sedimentaram e permaneceram segregados no fundo do biorreator de Taylor devido ao seu grande tamanho.



Fonte: Acervo pessoal.

A formação de esferoides, representado por C_E , contribui na quantidade de esferoides presentes no biorreator. A quantidade aumenta inicialmente devido a aglomeração das células livres. Eventualmente, quando se atingia uma quantidade considerável de esferoides

no biorreator, eles colidiam uns com outros e aglomeravam-se entre si, aumentando o tamanho dos esferoides, mas diminuindo a quantidade de esferoides total e em suspensão.

A esfericidade (ESF), começa alta, pois as células isoladas têm um formato circular. Após certo tempo, devido a colisão célula-célula e aglomerado-células serem aleatórias, as partículas vão perdendo seu formato circular. Com o passar do tempo, as células foram se acomodando e devido à natureza da movimentação do fluido no biorreator, o agregado foi ganhando formato de esferas como detalhado na Figura 35. Os esferoides eventualmente perderam o formato de esferas quando dois esferoides começavam a aglomerar, como verificado na Figura 34 e a partir deste momento a esfericidade começou a oscilar com o tempo.

As variáveis C_X , C_E , D_M , e ESF seguem o mesmo padrão em todos os cultivos, sendo as grandes diferenças o tempo de cultivo para atingir agregação máxima, como pode ser verificado nas curvas dos experimentos descritos a seguir.

5.3 Resultados obtidos referentes as características dos cultivos

5.3.1 Tempo de duração do cultivo

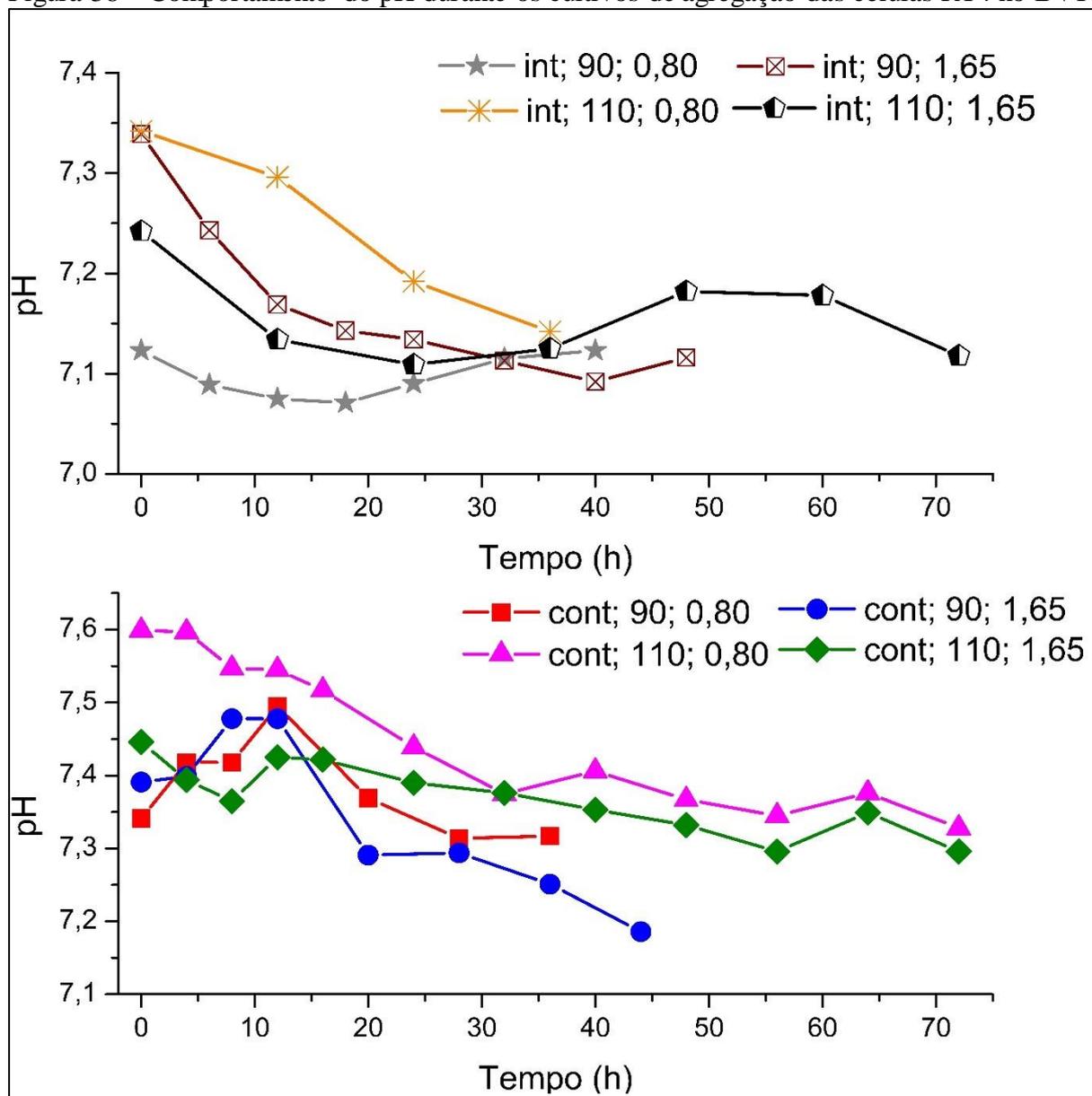
O tempo de duração de cada experimento foi definido de acordo com o diâmetro ou da concentração de esferoides. Caso um desses valores diminuíssem muito, o cultivo era finalizado. Um dos motivos para a retirada de amostras em tempos curtos foi para acompanhar com mais detalhes o decaimento das células isoladas, a aglomeração das células e a formação dos esferoides. A frequência de retirada de amostra era modificada convenientemente para evitar interrupções no cultivo e para não ficar com um número de células muito baixo no biorreator.

5.3.2 Variação no pH em função do tempo

Na Figura 38 estão representadas as curvas de pH dos experimentos em função do tempo de cultivo. É evidente que o cultivo cont; 110; 0,80 foi o que apresentou o maior pH nas primeiras horas, o que pode não ter sido favorável a proliferação e agregação celular. É interessante notar que os cultivos nos quais a agitação foi contínua, o pH foi maior durante as primeiras 10 horas, intervalo em que todos eles apresentaram um pH acima de 7,40. Um dos possíveis motivos para essa elevação de pH se deve ao fato de que nos cultivos contínuos mais amostras foram retiradas nas primeiras horas. Cada vez que se retirava uma amostra, o biorreator tinha que ser removido da atmosfera com CO_2 controlada pela incubadora. Ao ser retirado da incubadora, o biorreator perdia gradativamente o CO_2 para o meio ambiente, e

quando era aberto dentro da câmara de biossegurança para a amostragem, boa parte do CO₂ acaba escapando.

Figura 38 – Comportamento do pH durante os cultivos de agregação das células RT4 no BVT.



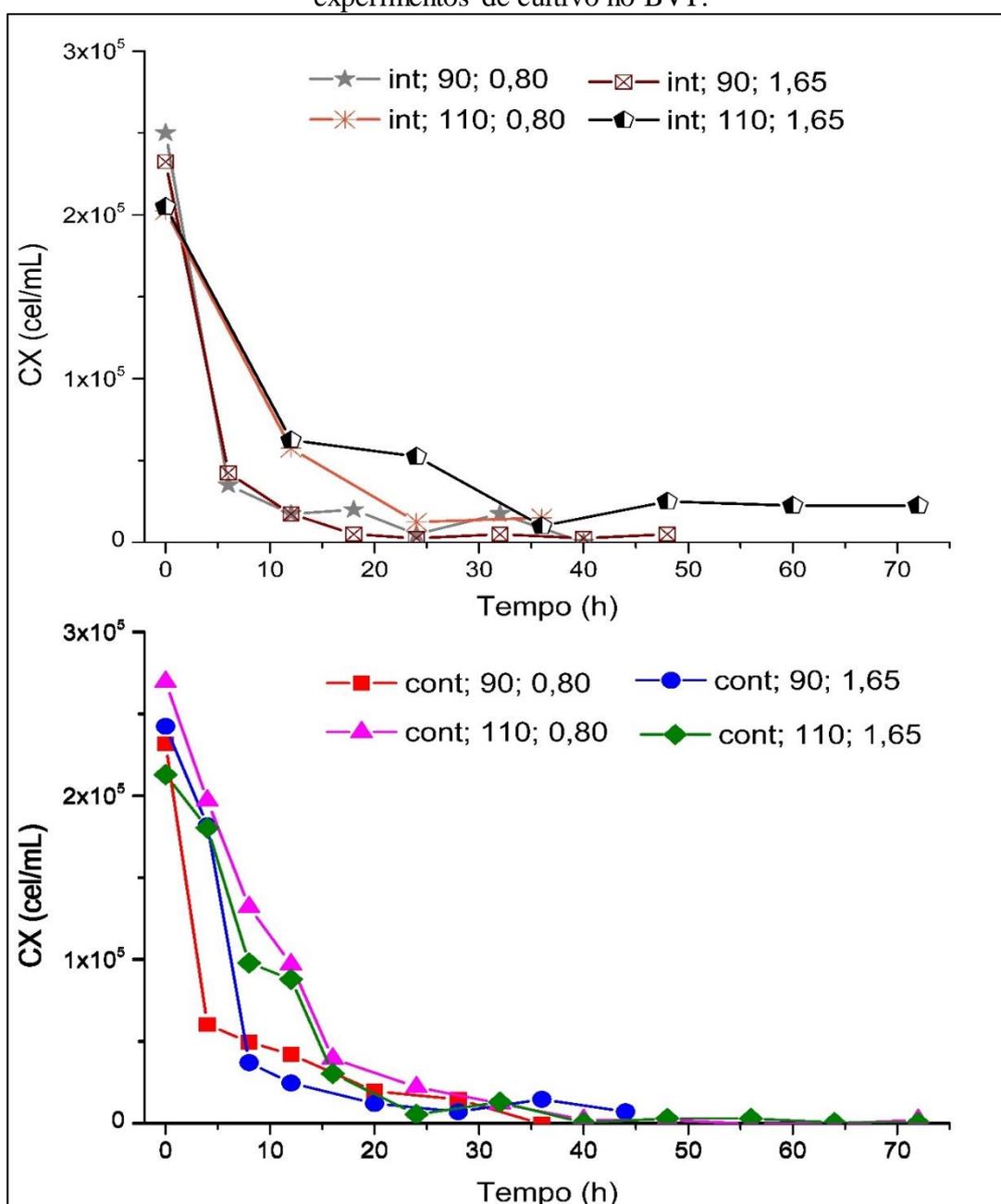
Fonte: Acervo pessoal.

5.3.3 Células livres em suspensão

A inoculação no biorreator era feita praticamente só com células livres. Durante o cultivo o número de células livres diminuía porque elas iam se aglomerando uma com as outras e eventualmente colidiam e agregavam com outros aglomerados já formados. A quantidade de células livres em suspensão diminui rapidamente e nas primeiras 20 horas de cultivo, atingindo valores muito baixos.

O cultivo que ocorreu a 110 rpm, 1,65 cP e com agitação intermitente, foi no que a célula RT4 mais demorou para aglomerar e também no que menos aglomerou células. Nos cultivos com velocidade de agitação de 90 rpm, foram os que aglomeraram mais rapidamente. Apesar de teoricamente haver mais colisão entre célula e agregados a 110 rpm, a alta tensão de cisalhamento provocada pela agitação tende a romper os agregados ou a desagregar. Esse raciocínio também explica porque o menor cisalhamento a 90 rpm favorece mais a aglomeração do que a 110 rpm. Esse comportamento pode ser verificado na Figura 39.

Figura 39 – Resultados de concentração das células RT4 livres em função do tempo nos experimentos de cultivo no BVT.



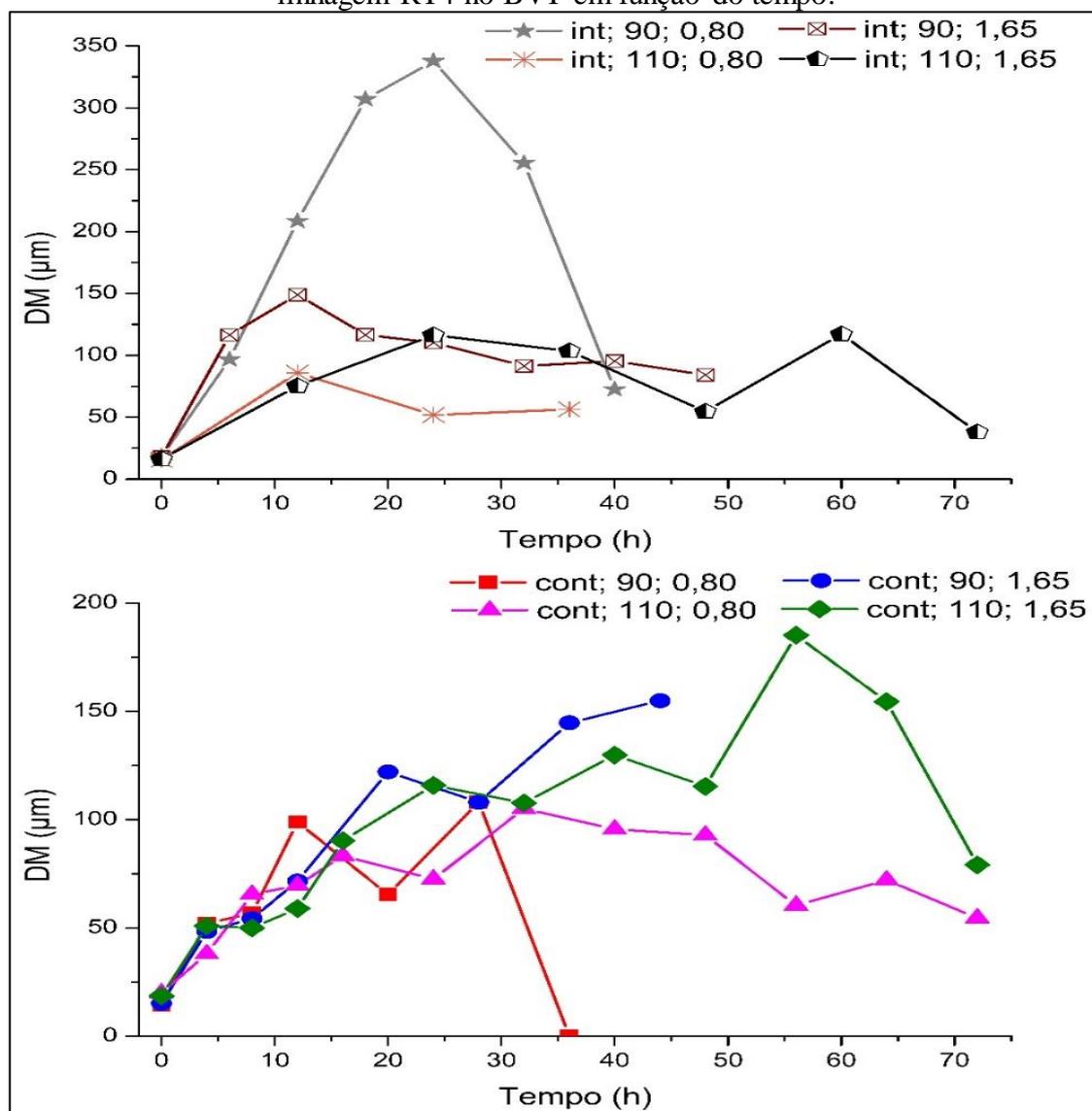
Fonte: Acervo pessoal.

5.3.4 Diâmetro médio em suspensão em função do tempo.

A Figura 40 ilustra o comportamento dos diâmetros médios dos esferoides durante os experimentos com a RT4. O cultivo 1 que ocorre nas condições de 90 rpm, 0,80 cP e agitação intermitente apresentou um valor de diâmetro médio na faixa de 300 μm a 350 μm . Os experimentos nas condições de 110 rpm, 1,65 cP e agitação intermitente, 90 rpm, 1,65 cP e agitação contínua e 110 rpm, 1,65 cP e agitação contínua também apresentaram um bom tamanho de esferoide.

De todos os cultivos, apenas o experimento que ocorre na condição de 110 rpm, 0,80 cP e agitação intermitente não atingiu em nenhum momento o diâmetro médio de 100 μm .

Figura 40 – Resultados de medida do diâmetro médio dos agregados durante os cultivos da linhagem RT4 no BVT em função do tempo.



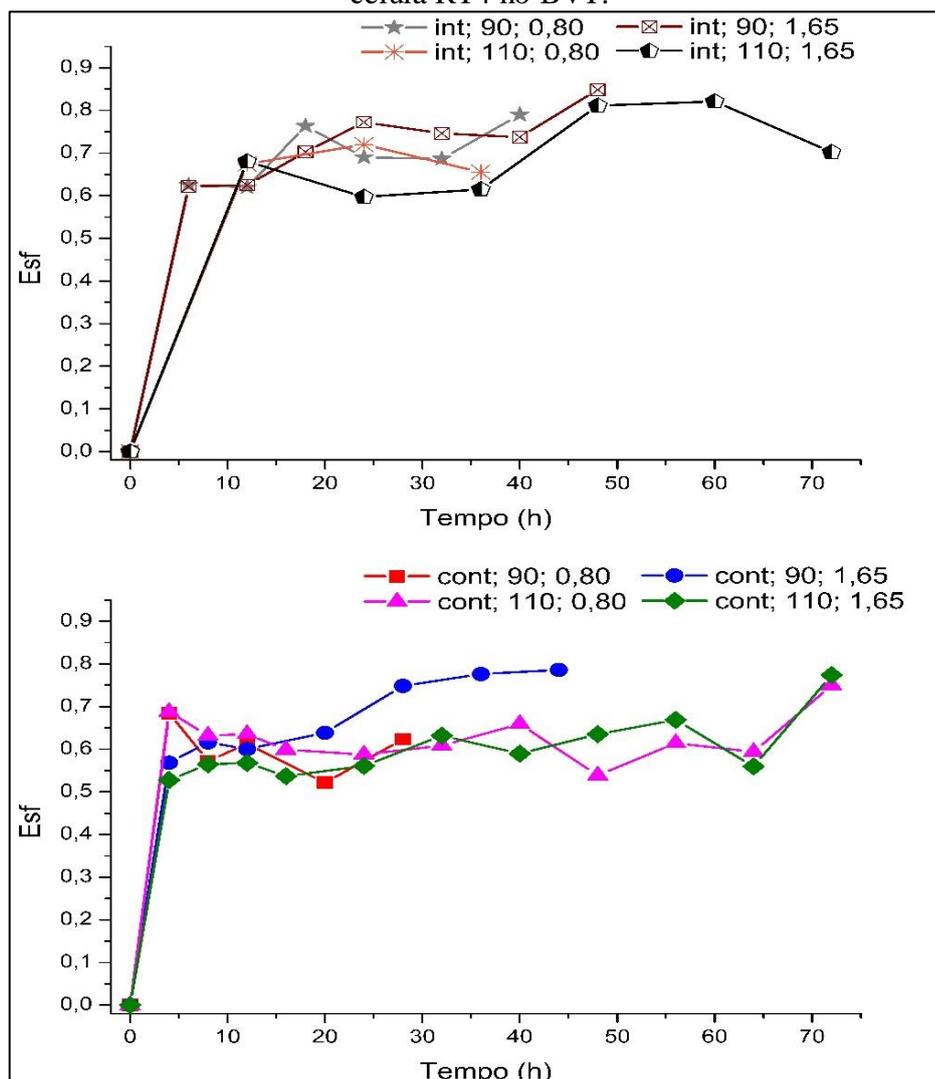
Fonte: Acervo pessoal.

Apesar de apenas em um experimento o diâmetro médio ter superado o valor de 300 μm , esse resultado indica que foi possível cultivar células em agregados no BVT. Previamente, CURRAN; BLACK, 2004 haviam conseguido cultivar células de fibroblastos de roedor e SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011 cultivaram as células CHO no BVT, porém, ambas as células não cresciam em forma de agregados e não formavam esferoides.

5.3.5 Esfericidade

A esfericidade quantifica quanto um agregado se aproxima do formato de uma esfera de acordo com os cálculos fornecidos pelo software ImageJ. Quase todos os experimentos apresentarem em algum momento um valor de Esfericidade próximo de 0,8 com exceção dos cultivos do cultivo a 110 rpm, 0,80 cP e agitação intermitente e a 90 rpm, 0,80 cP e agitação contínua. Esses cultivos também foram os mais curtos e por este motivo talvez não tenham alcançado um bom valor de Esfericidade. Os cultivos a 110 rpm, 0,80 cP e agitação contínua e a 110 rpm, 1,65 cP e agitação contínua, em particular, só aproximaram-se de um valor de Esfericidade de 0,80 após 72 horas de cultivo.

Figura 41 – Resultados das medidas de esfericidade dos agregados obtidos nos cultivos da célula RT4 no BVT.



Fonte: Acervo pessoal.

5.3.6 Número de esferoides durante o tempo de cultivo

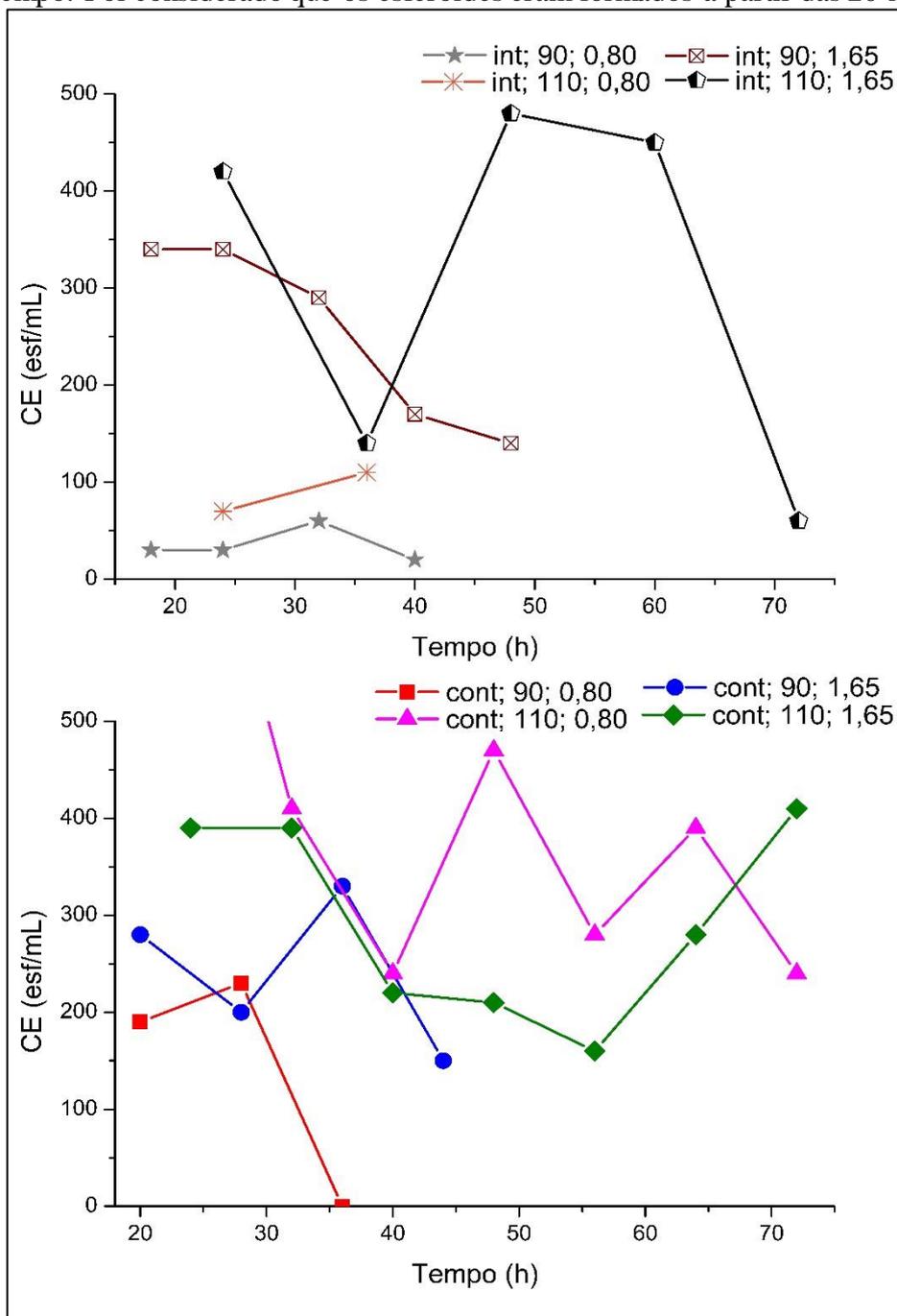
A concentração de esferoides começou a ser contabilizado a partir do momento em que os agregados formados nos primeiros instantes se compactaram e se acomodaram e assumiram uma forma semelhante à de uma esfera. No biorreator, o tempo que levou para que os agregados se tornassem esferoides foi em torno de 20 horas.

Os cultivos que se destacaram por apresentarem maiores concentrações de esferoides, acima de 400 esf/mL, foram os cultivos int; 110; 1,65, cont; 110; 0,80 e cont; 110; 1,65 e os cultivos int; 90; 0,80 e int; 110; 0,80 foram os que produziram poucos esferoides.

Mesmo as maiores concentrações de esferoides obtidos nestes experimentos não atingiram a mesma concentração de esferoides que SANTO et al., 2016 obteve em seus cultivos em biorreator spinner. Um dos possíveis motivos para esse número reduzido de esferoides é

representado nas curvas Figura 42, que mostra o decaimento dos esferoides após certo tempo de cultivo. Isso acontece que ao tamanho das partículas, já que os esferoides maiores tendem a sedimentar pela ação da força gravitacional. Como consequência disto a amostragem de meio de cultura com esferoides na parte superior do biorreator tende a ficar menos representativa, mostrando valores de diâmetro médio inferiores aos reais.

Figura 42 – Resultados de concentração de esferoides nos cultivos de célula RT4 em função do tempo. Foi considerado que os esferoides eram formados a partir das 20 horas.



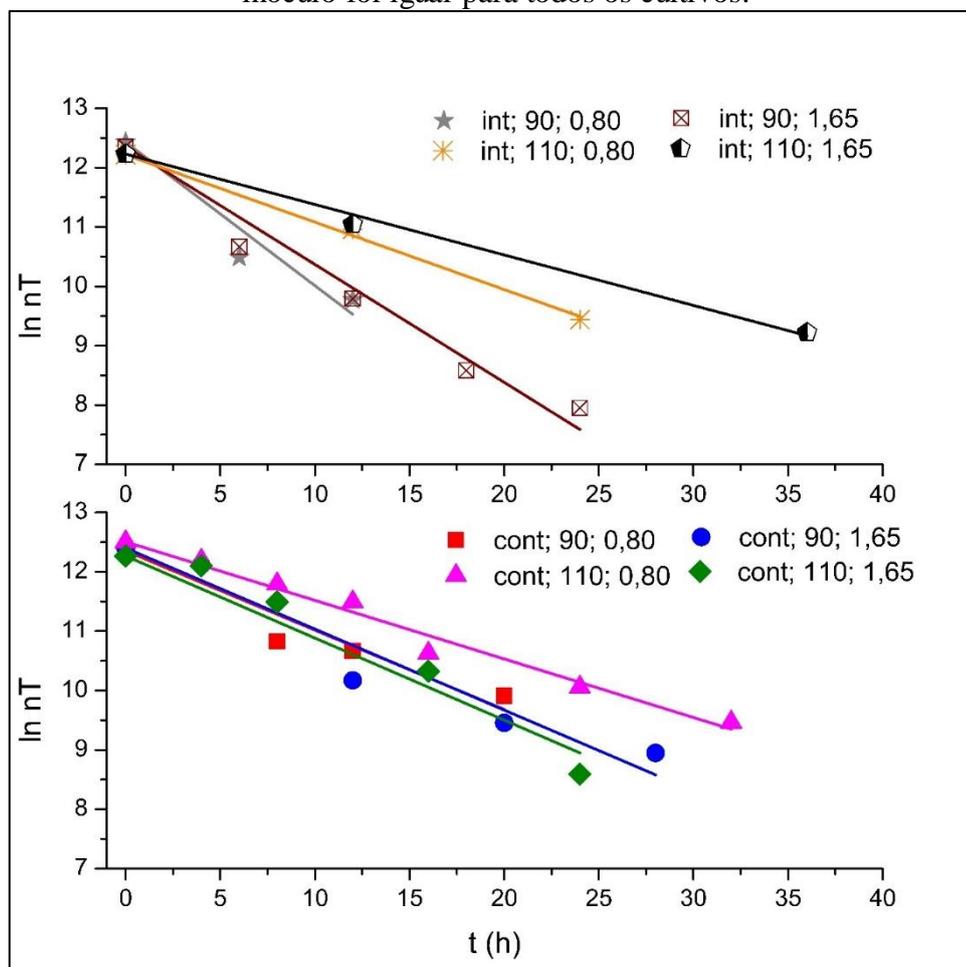
Fonte: Acervo pessoal.

5.4 Análise da cinética de agregação da célula RT4

As condições de agregação da célula RT4 no BVT preenchem as características típicas de um caso de agregação ortocinética (ELIMELECH, 1995). Por ser uma célula não invasiva a motilidade não contribuiu muito no processo de agregação, o crescimento celular tem pouca influência no processo de agregação nas primeiras 35 horas dos cultivos, a faixa de tamanho da partícula variando de 10 μm a 1 mm está no intervalo onde predomina a agregação ortocinética, a taxa de cisalhamento e a fração volumétrica (volume de sólidos/volume total) nos cultivos contínuos foi mantida aproximadamente constante. Nessas condições a constante de agregação das partículas primárias (células RT4) foi obtida através da utilização da Equação 16. Esta modelagem foi aplicada aos dados de concentração de partículas em função do tempo obtidos nos cultivos e seus resultados são apresentados na Figura 43. O valor absoluto do coeficiente angular calculado por regressão linear para cada reta plotada no gráfico representa o valor da constante de velocidade de agregação. No gráfico, o ponto inicial de $\ln C_{X0}$ foi fixado pois este ponto representa com mais fidelidade a quantidade de células na inoculação do BVT.

$$k_{agreg} = -\text{coeficiente angular}$$

Figura 43 – Comportamento da cinética de agregação das células RT4 nos experimentos de cultivo no BVT. As retas representam a regressão linear dos dados experimentais de número de agregados totais T em função do tempo t. O valor inicial de N_T foi prefixado já que o inóculo foi igual para todos os cultivos.



Fonte: Acervo pessoal.

Os valores das velocidades de agregação e os valores de R^2 estão apresentados na Tabela 15. Em todos os cultivos foi possível ajustar o modelo da equação de agregação. Apesar desta modelagem se basear em um ambiente onde a agitação é contínua, o modelo de agitação intermitente também se encaixou bem no modelo, porém com um número de pontos reduzidos.

Tabela 15 – Valores das constantes de agregação k_{ag} R^2 dos cultivos realizados com a célula RT4 no BVT.

Cultivo	k_{ag} (h^{-1})	R^2
Int; 90; 0,80	0,24 ± 0,03	0,9202
Int; 90; 1,65	0,19 ± 0,01	0,9628
Int; 110; 0,80	0,11 ± 0,01	0,9963
Int; 110; 1,65	0,08 ± 0,01	0,9935
Cont; 90; 0,80	0,13 ± 0,01	0,9146
Cont; 90; 1,65	0,13 ± 0,01	0,9385
Cont; 110; 0,80	0,10 ± 0,01	0,9803
Cont; 110; 1,65	0,14 ± 0,01	0,9503

Fonte: Acervo pessoal.

No geral os cultivos nos quais o método de agitação foi intermitente teve uma constante de agregação maior que a dos cultivos contínuos. Este fenômeno pode ser explicado lembrando que o processo de agregação normalmente é reversível, ou seja, envolve também um processo de rompimento do agregado. Neste caso o comportamento da célula RT4 pode ser em função das ligações célula-célula e célula-matriz extracelular que se formam entre duas células que colidem e que se estabilizam e fortalecem mais na ausência de cisalhamento, quando a agitação é interrompida. No caso do cultivo com agitação contínua os agregados formados ficam menos consolidados e mais susceptíveis ao rompimento.

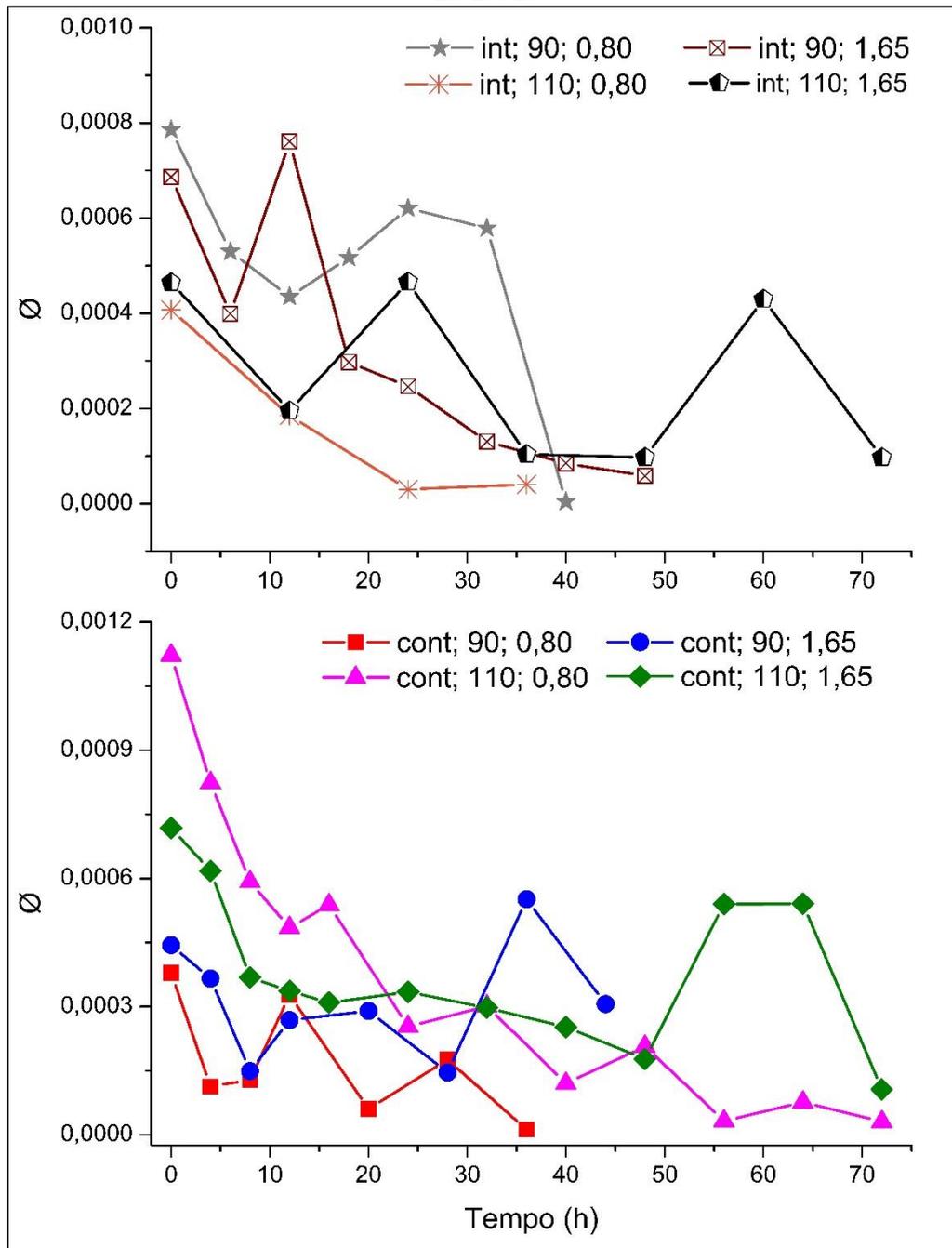
Na agitação intermitente, a constante de agregação diminui como o aumento da viscosidade. Porém, diminui com o aumento do cisalhamento contrariando a previsão da teoria. Não se encontrou uma explicação plausível para este comportamento. Já nos cultivos com agitação contínua, o experimento Cont; 110; 0,80 aparentemente muito baixo, possivelmente devido ao valor de pH muito alto com que iniciou o cultivo como pode ser verificado na Figura 38. Esse experimento precisa ser refeito para poder confirmar a coerência dos resultados dos experimentos com agitação.

A Figura 44 representa o comportamento da fração volumétrica dos cultivos feitos com as células RT4 no BVT utilizando a Equação 14 em todos os pontos. Apesar de algumas retas apresentarem oscilações, percebe-se que no geral, a fração volumétrica no primeiro ponto é maior que os pontos finais. Uma das justificativas é devido a formação de

grandes aglomerados, nos quais não são amostrados pois não estão em suspensão e estes apresentam um grande volume de células. Outro possível motivo é devido ao fato das células se compactarem para a formação dos esferoides.

Para o cálculo do k_{ag} foi assumido que \emptyset era constante, porém observando a Figura 44 percebe-se que houve variação no \emptyset . Necessita-se futuramente verificar se esta variação é significativa e se essa variação compromete no valor de k_{ag} .

Figura 44 - Comportamento fração volumétrica das células RT4 nos experimentos de cultivo no BVT.



Fonte: Acervo pessoal.

5.5 Verificação dos efeitos nas respostas

Os efeitos foram apresentados na Tabela 16 foram calculados pelas Equação 19, Equação 20 e Equação 21. Os efeitos indicam o quanto as variações dos níveis das variáveis interferem nas respostas. Os efeitos da Tabela 16 representam para o cultivo intermitente.

Tabela 16 – Principais efeitos causados pela velocidade de rotação e pela viscosidade dinâmica nas variáveis resposta no planejamento do cultivo com agitação intermitente.

	$y = D_m$ (μm)	$y = C_E$ (cP)	$y = \text{esf}$
$\overline{y\Omega}$	-96	235	0,02
$\overline{y\mu_f}$	-42	185	0,12
$\overline{y\Omega x \mu_f}$	103	-125	0,04

Fonte: Acervo pessoal

Os efeitos negativos indicaram que o aumento do nível da variável independente diminuiu o valor da resposta, os efeitos positivos indicam que elevando o nível da variável independente gerou um aumento no valor da resposta e o valor desses efeitos indicam o quanto esses valores podem ser considerados significativos.

Pela Tabela 16 verifica-se que o valor da resposta D_m tende a reduzir com o aumento de Ω e de μ_f . O efeito da interação $\Omega x \mu_f$, no entanto, indicou, que se ambas as variáveis forem aumentadas simultaneamente, pode haver um aumento no D_m . Já para a resposta C_E , houve um favorecimento quando se acrescentou Ω e de μ_f . Em contrapartida, houve uma diminuição de C_E no aumento simultâneo das duas variáveis. A resposta esf aumentou quando se elevou o nível de Ω , de μ_f e das duas simultaneamente ($\Omega x \mu_f$).

A Tabela 17 apresenta os mesmos efeitos para a condição de agitação contínua. Neste caso o aumento de Ω influenciou na diminuição de D_m e o acréscimo de μ_f causou uma elevação no D_m . A interação das duas variáveis não causa nenhum efeito na resposta D_m . Para a resposta C_E , o aumento de nível de Ω elevou C_E , e o aumento de μ_f e $\Omega x \mu_f$ diminuíram C_E . As variáveis que apresentaram um efeito positivo para a resposta esf foram Ω e $\Omega x \mu_f$ enquanto que o aumento de μ_f resultou em um efeito negativo.

Tabela 17 – Principais efeitos causados pela velocidade de rotação e pela viscosidade dinâmica nas variáveis resposta no planejamento do cultivo com agitação contínua.

	$y = D_m$ (μm)	$y = C_E$ (cP)	$y = \text{esf}$
$\overline{y\Omega}$	-36	315	-0,09
$\overline{y\mu_f}$	36	-155	0,10
$\overline{y\Omega x\mu_f}$	0	-255	-0,06

Fonte: Acervo pessoal

Dentre as principais diferenças entre os dois cultivos, a resposta que apresentou maior diferença foi a esfericidade. No cultivo contínuo o aumento de Ω e da interação $\Omega x \mu_f$ apresentaram um efeito negativo e no cultivo com agitação intermitente essas variáveis causaram um efeito positivo. O motivo desta diferença foi devido ao fato que com a agitação constante, os esferoides e as células livres estão constantemente expostas ao cisalhamento causado pela agitação principalmente no estágio inicial da formação dos agregados e esferoides.

Outra diferença notável foi o efeito nas repostas D_M e C_E causado pela variável μ_f . No cultivo intermitente, o aumento de μ_f causa uma diminuição em D_m e um aumento em C_E , e no cultivo contínuo o mesmo aumento de μ_f resulta no acréscimo de D_M e na redução de C_E . Como μ_f tem o potencial de influenciar na hidrodinâmica de um cultivo em biorreator, era de se esperar que um em diferentes métodos de agitação está variável apresentasse uma diferença nas respostas.

Como neste trabalho não foi feito replicata dos experimentos, não foi possível determinar algum efeito causado pela variação da variável independente foi significativo.

5.6 Combinação das respostas

O cálculo da função desejabilidade foi realizado através da normalização do diâmetro médio e da concentração de esferoides demonstradas nas Equação 22 e Equação 23 e também utilizando o valor da esfericidade fornecido pelo programa imageJ. A combinação dos vetores normais leva a função desejabilidade calculado pela Equação 25 e os resultados são apresentados na Tabela 18 em ordem decrescente do valor de FD.

Tabela 18 – Resultados dos cálculos da combinação das respostas nos cultivos da célula RT4 no BVT. Os valores são apresentados em ordem decrescente do valor de FD.

Cultivo	t (h)	ADM	ACE	Esf	FD
Int; 110; 1,65	60	0,29	0,44	0,82	0,4712
Cont; 90; 1,65	36	0,36	0,31	0,78	0,4431
Cont; 110; 0,80	24	0,18	0,71	0,59	0,4225
Int; 90; 1,65	24	0,28	0,32	0,77	0,4100
Cont; 110; 1,65	32	0,27	0,38	0,63	0,4012
Cont; 90; 0,80	28	0,27	0,22	0,62	0,3326
Int; 90; 0,80	32	0,64	0,05	0,69	0,2806
Int; 110; 0,80	36	0,14	0,11	0,66	0,2169

Fonte: Acervo pessoal

A Tabela 19 é semelhante a Tabela 18, porém com os valores dos diâmetros médios e seu desvio padrão e concentração de esferoides.

Tabela 19 – Resultados dos cálculos da combinação das respostas nos cultivos da célula RT4 no BVT. Os valores são apresentados em ordem decrescente do valor de FD.

Cultivo	t (h)	D_m (µm)	C_E (esf/mL)	Esf	FD
Int; 110; 1,65	60	117 ± 179	450	0,82	0,4712
Cont; 90; 1,65	36	144 ± 48	330	0,78	0,4431
Cont; 110; 0,80	24	72 ± 17	800	0,59	0,4225
Int; 90; 1,65	24	110 ± 29	340	0,77	0,4100
Cont; 110; 1,65	32	108 ± 43	390	0,63	0,4012
Cont; 90; 0,80	28	108 ± 32	230	0,62	0,3326
Int; 90; 0,80	32	255 ± 166	30	0,69	0,2806
Int; 110; 0,80	36	56 ± 9	390	0,66	0,2169

Fonte: Acervo pessoal.

Os dois melhores cultivos foram o com agitação intermitente, a 110 rpm e viscosidade de 1,65 cP e o cultivo com agitação contínua a 90 rpm e viscosidade 1,65 cP. Foi interessante observar que os dois cultivos que apresentaram melhores resultados ocorreram a uma maior viscosidade e os três resultados menos favoráveis, ocorreram a uma baixa viscosidade.

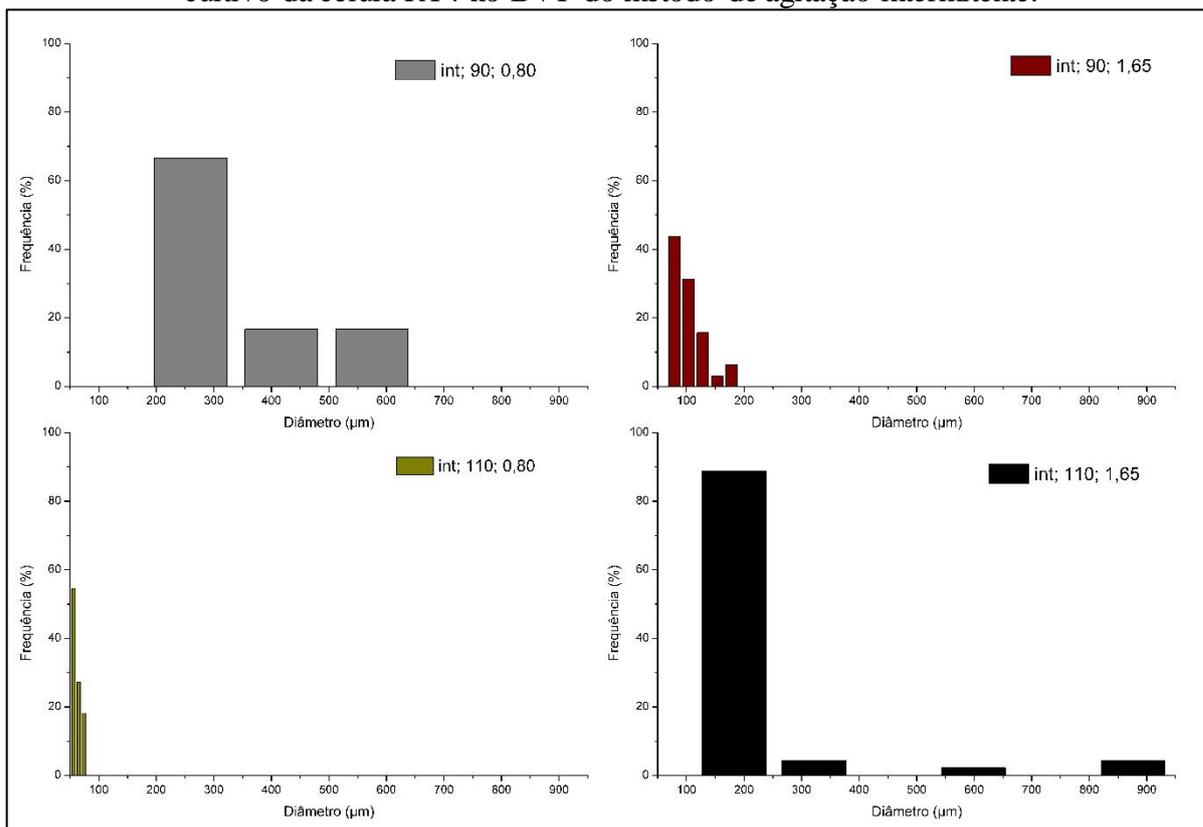
A uma agitação menor, o cultivo contínuo foi o que apresentou melhor e resultado. Uma das possíveis razões é a alta taxa de cisalhamento de agitações maiores retardava a aglomeração e a formação dos esferoides. É possível que a melhor combinação seja começar um cultivo a uma agitação mais baixa e aumentar à partir de certo tempo para conseguir obter esferoides em tamanhos maiores impedir que os esferoides decantem assim como sugere SANTO et al., 2016.

É interessante também observar o tempo em que os cultivos Int; 110; 1,65 e Cont; 90; 1,65 levaram para chegar ao resultado otimizado. Enquanto o cultivo menor agitação levou 36 horas para chegar ao seu melhor resultado, o cultivo a maior agitação levou 60 horas para chegar ao seu melhor resultado. Isso pode ser um indicativo que a mudança de agitação durante o cultivo, após a formação dos esferoides pode auxiliar na formação de esferoides maiores em maiores quantidades.

O cultivo Int; 90; 0,80 foi o cultivo com maior diâmetro, porém com poucos esferoides. Isso se refletiu na alta velocidade de agregação que este cultivo apresentou. O cultivo Int; 110; 1,65 foi o que apresentou uma menor velocidade de agregação e isso refletiu no tempo em que levou para os esferoides crescerem.

O grande problema do cultivo que apresentou o melhor resultado (Int; 110; 1,65) foi o grande valor do desvio padrão no tamanho do diâmetro. Isso pode ser verificado nas Figura 45 e Figura 46 que mostram os histogramas da distribuição de tamanho de cada cultivo. Na prática, se trata de um problema de fácil solução, já que podem ser separados em diferentes faixas de tamanho com variância pequena por meio de peneiramento.

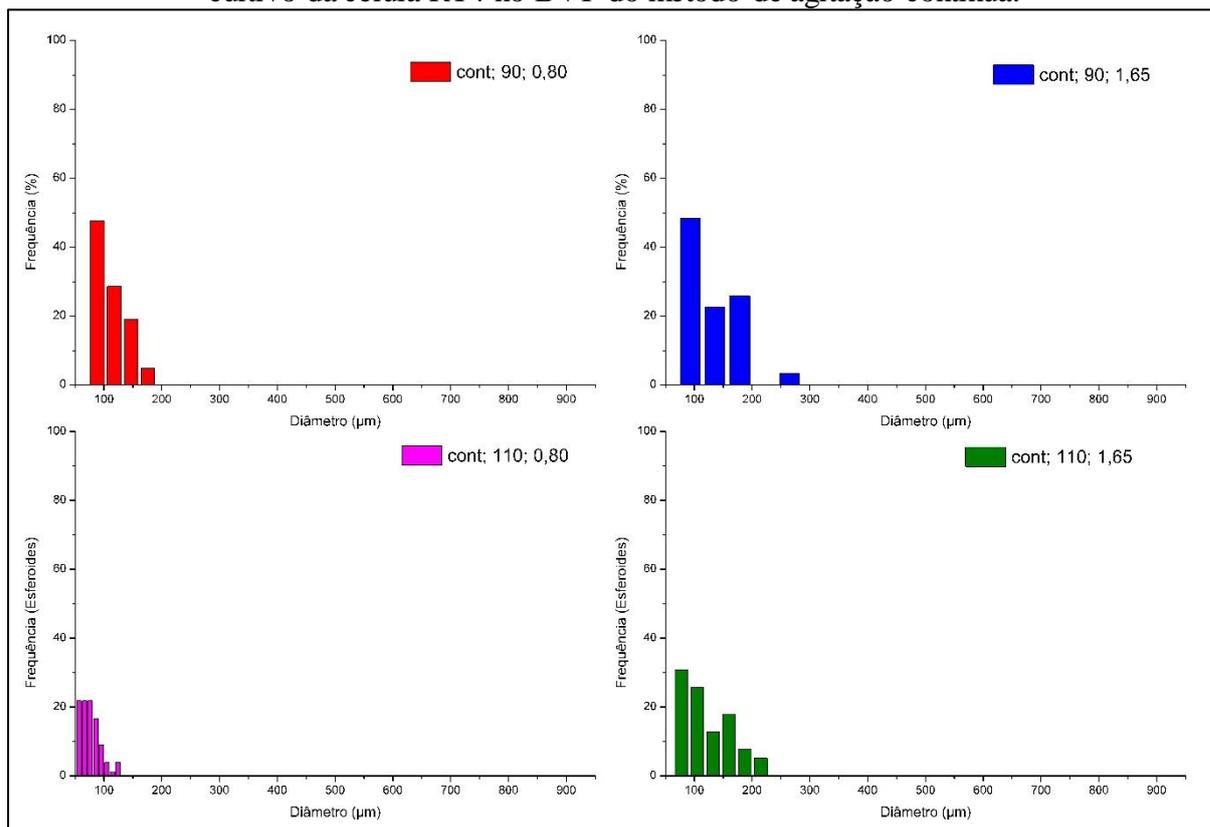
Figura 45 – Histograma da distribuição de diâmetro dos esferoides em diferentes condições de cultivo da célula RT4 no BVT do método de agitação intermitente.



Fonte: Acervo pessoal.

Na Figura 45, percebeu-se que os esferoides no cultivo de velocidade de agitação de 90 rpm com a viscosidade de 0,80 cP, a distribuição de diâmetros é grande já que se distribuem no tamanho de 200 até 600 μm. De maneira semelhante, os esferoides do cultivo de agitação de 110 rpm e com viscosidade de 1,65 cP apresentaram uma distribuição de diâmetro que abrange de 150 a 900 μm. Este último cultivo, apresentou o melhor resultado combinando diâmetro médio, concentração de esferoides e esfericidade. No entanto o desvio padrão do diâmetro é alto se comparado aos outros desvios padrões e isso se confirmou no histograma que representa seu diâmetro. Apesar disso, mais de 80% de seus esferoides se concentram na região entre 150 a 250 μm. Os outros cultivos intermitentes apresentaram uma distribuição menos ampla, e isso se refletiu no menor desvio padrão.

Figura 46 - Histograma da distribuição de diâmetro dos esferoides em diferentes condições de cultivo da célula RT4 no BVT do método de agitação contínua.



Fonte: Acervo pessoal.

Na Figura 46, é representado o mesmo histograma, mas para cultivos contínuos. No cultivo contínuo, não houve uma distribuição de tamanho tão grande quanto nos cultivos Int; 110; 1,65 e Int; 90; 0,80. Nos cultivos contínuos os desvios padrões não foram muito altos, o que explica a razoável distribuição de tamanho deste método.

Comparando com o cultivo feito em biorreator spinner por SANTO et al., (2016), o tamanho dos esferoides obtido em seu experimento não foi muito diferente, já que os diâmetros de esferoides que ele obteve variou de 81 µm a 298 µm dependendo do tipo de célula de câncer utilizada. Na linhagem de câncer de mama MCF7 e HCC1954 ele obteve os diâmetros de 144 µm e 149 µm, respectivamente, valores semelhantes ao do cultivo 6. É importante notar que em algumas linhagens, inclusive na HCC1954, SANTO et al., (2016) variaram o nível de agitação do cultivo para manter as células em suspensão, algo não feito nestes experimentos.

Apesar de nenhum dos cultivos em suas melhores condições apresentarem um diâmetro médio acima de 300 µm, RAGHAVAN et al., 2016 mostraram que o uso de esferoides maiores não implica necessariamente em maior resistência a agentes citotóxicos. Nos seus experimentos os esferoides produzidos em placas não aderentes apresentaram diâmetros

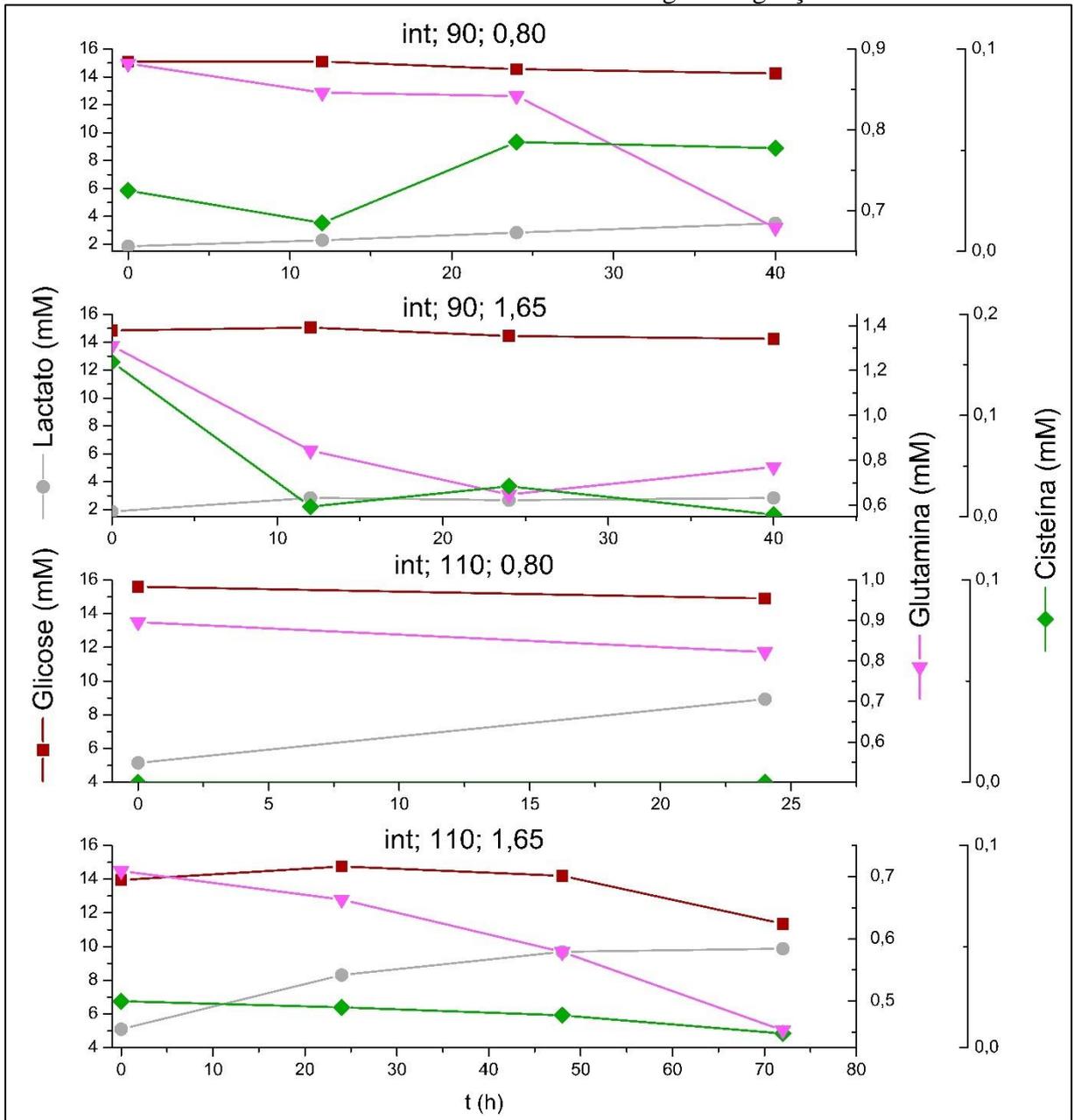
maiores que os esferoides produzidos por gota pendente, porém também se apresentaram menos resistentes ao agente citotóxico cisplatina.

RAGHAVAN et al., 2016 também sugerem que com uma certa agitação em cultivos, os esferoides podem ficar mais resistente. Eles mostraram isso com as linhagens celulares de câncer de mama (MCF7) e de ovário (OVSCAR 8) no qual produziram esferoides das células em placas não aderentes com e sem agitação. Na placa com agitação os esferoides se apresentaram menores do que na placa com agitação, mas também se mostraram mais resistente ao agente citotóxico cisplatina. Isso sugere que a agitação auxiliou na compactação das células formando assim esferoides mais resistentes e mais próximos aos produzidos pela gota pendente.

5.7 Análise de glicose, lactato e aminoácidos

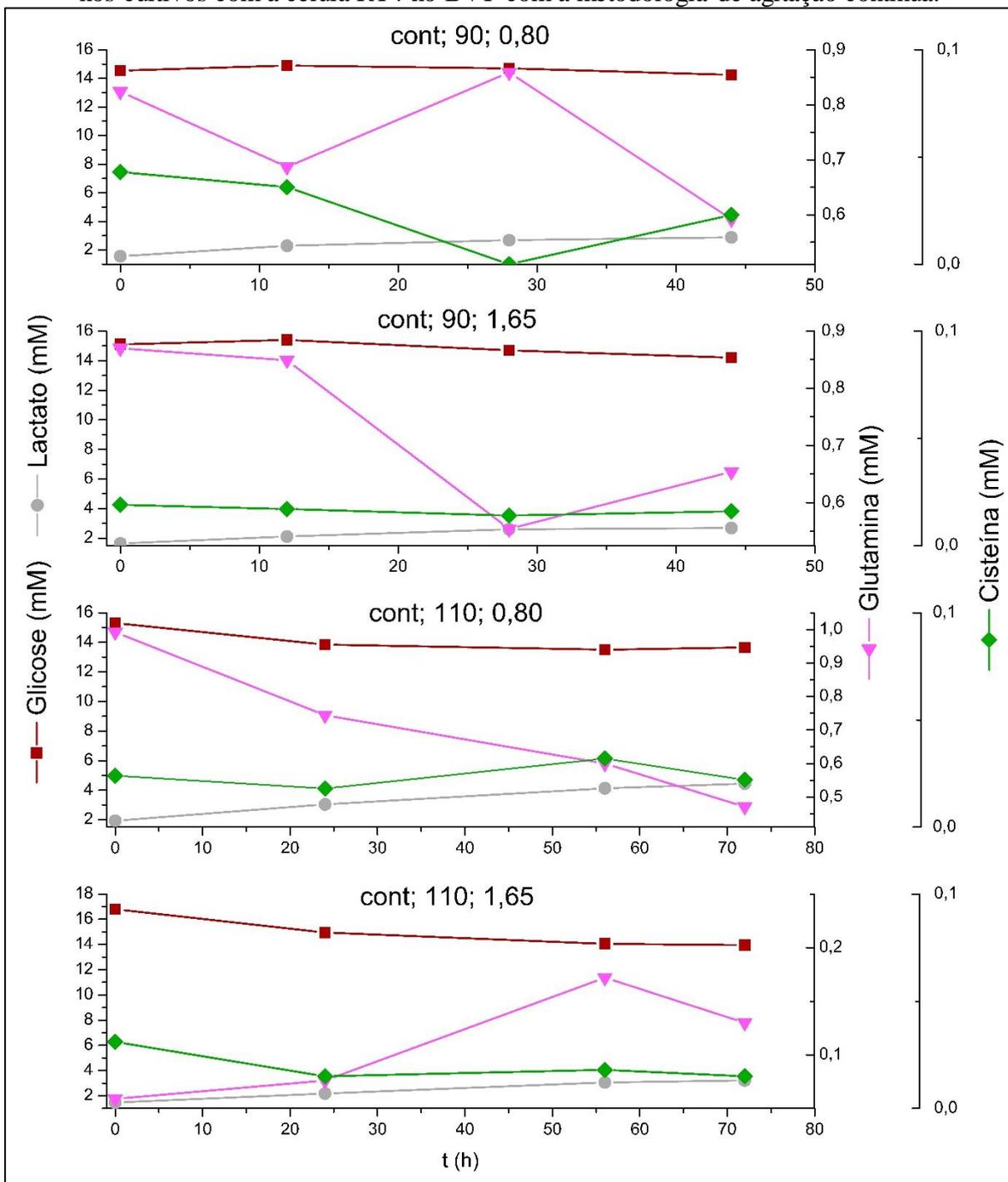
As análises de glicose, lactato e de aminoácidos foram feitos com os sobrenadantes das amostras. Parte de seus resultados estão ilustrados na Figura 47 e na Figura 48. Esses resultados representaram a concentração de glicose e glutamina pois ambos eram nutrientes essenciais para as células, do aminoácido cisteína pois em alguns cultivos eles foram totalmente consumidos e do metabólito lactato pois em altas concentrações ele pode ser tóxico para as células.

Figura 47 – Resultados das análises de concentração de glicose, lactato, glutamina e cisteína nos cultivos com a célula RT4 no BVT a metodologia de agitação intermitente.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 48 – Resultado das análises de concentração de glicose, lactato, glutamina e cisteína nos cultivos com a célula RT4 no BVT com a metodologia de agitação contínua.



Fonte: Acervo pessoal.

No cultivo int, 110; 0,8 (Figura 47), a cisteína estava esgotada desde o tempo de 0 horas. Esse pode ser um dos motivos deste cultivo ter apresentado o resultado menos favorável se comparado aos outros cultivos. Outro cultivo onde a cisteína se esgotou foi no cultivo cont; 90; 0,80 (Figura 48). Esse esgotamento foi apresentado no tempo de 28 horas e pode ter sido um erro de leitura pois no ponto de 44 horas a cisteína estava presente novamente.

O lactato não apresentou problemas em nenhum cultivo e apresentou resultados esperados. Em todos os cultivos sua concentração aumenta continuamente no meio, indicando que as células estão produzindo este metabólito, porém não atinge uma alta concentração.

A glicose está sempre em uma concentração consideravelmente mais alta que o lactato, porém apresenta alguns resultados incoerentes, já que há aumento em sua concentração, sendo necessário repetir a análise futuramente.

Assim como a glicose, a glutamina na maioria dos cultivos continuamente é consumida. Em alguns cultivos, no entanto, este aminoácido apresentou um aumento de concentração, sendo necessário repetir a análise de aminoácidos futuramente.

6 CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados, é possível concluir que foi possível obter esferoides em suspensão em grandes quantidades na maioria dos cultivos. Apenas no cultivo realizado a 90 rpm, 0,80 cP com agitação intermitente, os esferoides não ficaram em suspensão.

Os resultados obtidos com o delineamento experimental adotado demonstraram que a produção de esferoides no biorreator de Taylor pode ser otimizada mediante a escolha da estratégia de agitação e utilização de valores apropriados de viscosidade e de velocidade de rotação do cilindro interno.

O tamanho dos esferoides nos cultivos da célula RT4 variou aproximadamente entre 100 μm a 190 μm intervalo de diâmetros semelhantes aos já obtidos em biorreatores do tipo spinner por SANTO et al., (2016).

De todos os experimentos feitos, os que apresentaram melhores resultados foram os cultivos int; 110; 1,65 e cont; 90; 1,65 levando em consideração tamanho, quantidade e esfericidade do esferoide. É importante notar que os dois melhores resultados haviam adição de dextrana, mas sua metodologia de agitação e velocidade de agitação eram diferentes.

Foi interessante notar também que os cultivos que apresentaram resultados menos favoráveis, que foram os cont; 90; 0,80, int; 90; 0,80 e int; 110; 0,80 não havia adição de dextrana. Porém vale lembrar que este o cultivo int; 110; 0,80 houve esgotamento de cisteína, sendo necessário repeti-lo para verificar se a ausência deste aminoácido influenciou no resultado.

Em relação a modelagem da cinética de agregação baseada na equação de Smoluchowsky utilizada para estimar a velocidade de agregação, todos apresentaram um valor de R^2 acima de 0,90 o que representa um modelo matemático muito útil para calcular velocidades de agregação e formação de esferoides.

7 TRABALHOS FUTUROS

As próximas etapas da pesquisa de dissertação de mestrado são:

- a) Refazer alguns pontos da análise do comportamento do metabolismo da célula RT4 (glicose, aminoácidos e metabólitos);
- b) Verificar o comportamento da formação de esferoides quando houver variação na velocidade de agitação.
- c) Adicionar a velocidade de crescimento celular na modelagem matemática.
- d) Realizar um novo planejamento. O mais indicado é o delineamento composto central rotacional e tentar encontrar a região de otimização.

8 REFERÊNCIAS

ACHILLI, T.-M. et al. Quantification of the kinetics and extent of self-sorting in three dimensional spheroids. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 18, n. 4, p. 302–309, 2012.

ACHILLI, T.-M.; MEYER, J.; MORGAN, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347–1360, 2015.

AGASTIN, S. et al. Continuously perfused microbubble array for 3D tumor spheroid model. **Biomicrofluidics**, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2011.

ANDERECK, C. D.; LIU, S. S.; SWINNEY, H. L. Flow regimes in a circular Couette system with independently rotating cylinders. **Journal of Fluid Mechanics**, v. 164, p. 155–183, 1986.

ASTASHKINA, A.; GRAINGER, D. W. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 1–18, 2014.

BAO, B. et al. Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 255–264, 2011.

BARRILA, J. et al. Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 791–801, 2010.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro - a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 405–412, 2005.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, 2013.

BROWN, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. **Journal of Biomechanics**, v. 33, n. 1, p. 3–14, 2000.

CARVALHO, H. M. et al. A three-dimensional tissue culture model for the study of attach and efface lesion formation by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1771–1781, 2005.

CASTAÑEDA, F.; KINNE, R. K. Short exposure to millimolar concentrations of ethanol induces apoptotic cell death in multicellular HepG2 spheroids. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 126, n. 6, p. 305–310, 2000.

CHEN, N. et al. A parallel implementation of the cellular potts model for simulation of cell-based morphogenesis. **Computer physics communication**, v. 176, n. 11–12, p. 670–681, 2007.

CHERRY, R. S. Animal cells in turbulent fluids: details of the physical stimulus and the biological response. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 2, p. 279–299, 1993.

CHERRY, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. **Bioprocess Engineering**, v. 1, n. 1, p. 29–41, 1986.

CHERRY, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 8, p. 1001–1014, 1988.

CHERRY, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Growth and death rates of bovine embryonic kidney cells in turbulent microcarrier bioreactors. **Bioprocess Engineering**, v. 4, n. 2, p. 81–89, 1989.

CRISTIE DIEGO, P. et al. Aplicação das metodologias Desirability e Simplex para otimização das propriedades mecânicas em arames de aço temperados. **Production**, n. x, p. 598–610, 2015.

CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J.-F. P.; WANG, D. I. C. Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 8, p. 975–982, 1988.

CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J.-F.; WANG, D. I. C. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 29, n. 1, p. 130–141, 1987.

CROUGHAN, M. S.; SAYRE, E. S.; WANG, D. I. C. Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. **Biotechnology and bioengineering**, v. 33, n. 7, p. 862–872, 1989.

CURRAN, S. J.; BLACK, R. A. Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 24, p. 5859–5868, 2004.

DEAN, D. M. et al. Rods, tori, and honeycombs: the directed self-assembly of microtissues with prescribed microscale geometries. **Faseb journal**, v. 21, n. 14, p. 4005–4012, 2007.

DEAN, D. M.; MORGAN, J. R. Cytoskeletal-mediated tension modulates the directed self-assembly of microtissues. **Tissue Engineering. Part A**, v. 14, n. 12, p. 1989–1997, 2008.

DESMET, G.; VERELST, H.; BARON, G. V. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow-I. Description and modeling of the dispersion effects. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 8, p. 1287–1298, 1996.

DUGUAY, D.; FOTY, R. A.; STEINBERG, M. S. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 309–323, 2003.

DUNLOP, E. H.; NAMDEV, P. K. Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 14, p. 2263–2276, 1994.

DURAY, P. H. et al. Invasion of human tissue ex vivo by *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 10, p. 1747–1754, 2005.

EAGLE, H.; FOLEY, G. E. Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of anti-tumor agents. **Cancer Research**, v. 18, n. 9, p. 1017–1025, 1958.

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 2014.

ELIMELECH, M. et al. Modelling of aggregation processes. in: 6. Particle deposition & aggregation: measurement, modelling and simulation. **Butterworth heinemann** 1995. p. 157-202.

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 1, p. 59–74, 2011.

ENMON JR., R. M. et al. Aggregation kinetics of well and poorly differentiated human prostate cancer cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 580–588, 2002.

ENMON JR, R. M. et al. Dynamics of spheroid self-assembly in liquid-overlay culture of DU 145 human prostate cancer cells. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 6, p. 579–591, 2001.

FENNEMA, E. et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 108–115, 2013.

FERNANDES, T. G. et al. Stem cell bioprocessing for regenerative medicine. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 34–47, 2014.

FISCHER, T. M. Tank-tread frequency of the red cell membrane: dependence on the viscosity of the suspending medium. **Biophysical journal**, v. 93, n. 7, p. 2553–2561, 2007.

FOTY, R. A. et al. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. **Development (Cambridge, England)**, v. 122, n. 5, p. 1611–1620, 1996.

FOTY, R. A.; STEINBERG, M. S. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. **Developmental Biology**, v. 278, n. 1, p. 255–263, 2005.

FRIEDLANDER, S. K. Behavior of suspended particles in a turbulent fluid. **Aiche Journal**, v. 3, n. 3, p. 381–385, 1957.

GETZENBERG, R. H.; COFFEY, D. S. Changing the energy habitat of the cancer cell in order

to impact therapeutic resistance. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2089–2093, 2011.

GIL, L. V. G. **Avaliação da expansão de células estromais mesenquimais em biorreator de escoamento em vórtices de Taylor**. [s.l: s.n.].

GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. Performance of a continuous Taylor-Couette-Poiseuille vortex flow enzymic reactor with suspended particles. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1093–1101, 2000.

GIOVANNINI, S. et al. Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. **European cells and materials**, v. 20, p. 245–259, 2010.

GODARA, P.; NORDON, R. E.; MCFARLAND, C. D. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 4, p. 397–407, 2008.

GOLDBLUM, S. et al. Protective effect of methylcellulose and other polymers on insect cells subjected to laminar shear stress. **Biotechnology progress**, v. 6, n. 5, p. 383–390, 1990.

GRANER, F.; GLAZIER, J. A. **Simulation of biological cell coring using a 2-dimensional extended potts-model** **Physical Review Letters**, 1992.

GRIFFITH, L. G.; SWARTZ, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. 3, p. 211–224, 2006.

GULLER, A. E. et al. Bioreactor-based tumor tissue engineering. **Acta Naturae**, v. 8, n. 3, p. 44–58, 2016.

HAMBURGER, A. W.; SALMON, S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells. **Science**, v. 197, n. 4302, p. 461–463, 1977.

HARRISON, R. G. Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, v. 1, n. 5, p. 116–128, 1907.

HARRISON, R. G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. **Journal of Experimental Zoology**, v. 9, n. 4, p. 787–846, 1910.

HAUT, B. et al. Hydrodynamics and mass transfer in a Couette-Taylor bioreactor for the culture of animal cells. **Chemical Engineering Science**, v. 58, n. 3–6, p. 777–784, 2003.

HICKMAN, J. A. et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 9, p. 1115–1128, 2014.

HINZE, J. O. **Chapter 6 - Turbulent fluid and particle interaction**. [s.l: s.n.].

HIRSCHBERG, E. Tissue culture in cancer chemotherapy screening. **Cancer Research**, v. 18, n. 8, p. 869–878, 1958.

HU, W.-S. **Quantitative and mechanistic analysis of mammalian cell cultivation on microcarriers** Massachusetts Institute of Technology. [s.l: s.n.].

HUANG, L. et al. Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancers via hypoxia-inducible factor 1α . **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 136, n. 3, p. 447–56, 2010.

HUANG, P. Y.; HELLUMS, J. D. Aggregation and disaggregation kinetics of human blood platelets: Part II. Shear-induced platelet aggregation. **Biophysical journal**, v. 65, n. 1, p. 344–53, 1993.

IMAMURA, Y. et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1837–1843, 2015.

JANES, D. A.; THOMAS, N. H.; CALLOW, J. A. Demonstration of a bubble-free annular-vortex membrane bioreactor for batch culture of red beet cells. **Biotechnology Techniques**, v. 1, n. 4, p. 257–262, 1987.

JIN, H.-J. et al. A multicellular spheroid formation and extraction chip using removable cell

trapping barriers. **Lab on a chip**, v. 11, n. 1, p. 115–119, 2011.

KAUR, P. et al. Human breast cancer histoid : an in vitro 3-dimensional co-culture model that mimics breast cancer tissue. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 59, n. 12, p. 1087–1100, 2011.

KELM, J. M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 2, p. 173–180, 2003.

KELM, J. M.; FUSSENEGGER, M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. **TRENDS in biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 195–202, 2004.

KHORSHID, F. A. The effect of the medium viscosity on the cells morphology in reaction of cells to topography - I. **Proceedings of the 2nd Saudi Science Conference**, v. 98, n. March 2004, p. 67–98, 2005.

KIM, J. BIN. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Seminars in cancer biology**, v. 15, n. 5, p. 365–377, 2005.

KLEINMAN, H. K.; PHILP, D.; HOFFMAN, M. P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 526–532, 2003.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2–3, p. 135–142, 2002.

KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS. Damage mechanism of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entertainment. **Biotech Bioeng**, v. 36, n. 5, p. 476–483, 1990.

KUNZ-SCHUGHART, L. A. et al. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 9, n. 4, p. 273–285, 2004.

LAKHOTIA, S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: experiments and modeling. **Biotechnology and bioengineering**, v. 39, n. 1, p. 95–107, 1992.

LAYER, P. G. et al. Of layers and spheres : the reaggre gate approach in tissue engineering. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 131–134, 2002.

LEE, J. et al. Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4687–4694, 2009.

LI, J.; HE, F.; PEI, M. Creation of an in vitro microenvironment to enhance human fetal synovium-derived stem cell chondrogenesis. **Cell and Tissue Research**, v. 345, n. 3, p. 357–365, 2011.

LIN, R.-Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 9–10, p. 1172–1184, 2008.

LIU, H. et al. Biophysical characterization of bladder cancer cells with different metastatic potential. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 241–246, 2014.

LONGATI, P. et al. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 95 1-13, 2013.

MA, J. **Characterization and application of vortex flow adsorption for simplification of biochemical product downstream processing**. [s.l: s.n.].

MARKWAY, B. D. et al. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 1, p. 29–42, 2010.

MARTIN, Y.; VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7481–7503, 2005.

MASSAI, D. et al. A versatile bioreactor for dynamic suspension cell culture. Application to the culture of cancer cell spheroids. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.

MICHAELS, J. D. et al. Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid-mechanical injury. Viscometric and bioreactor studies using serum, pluronic F68 and polyethylene glycol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 2, p. 169–180, 1991.

MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumours. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 8, p. 583–592, 2006.

MOORE, C. M. V. **Characterization of a Taylor-Couette vortex flow reactor**. [s.l: s.n.].

MOREIRA, J. L. et al. Hydrodynamic effects on BHK cells grown as suspended natural aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, n. 4, p. 351–360, 1995a.

MOREIRA, J. L. et al. Effect of viscosity upon hydrodynamically controlled natural aggregates of animal cells grown in stirred vessels. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 5, p. 575–583, 1995b.

MOSCONA, A.; MOSCONA, H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. **Journal of anatomy**, v. 86, n. Pt 3, p. 287–301, 1952.

MRAKOVČIĆ, M. et al. Assessment of Long-Term Effects of Nanoparticles in a Microcarrier Cell Culture System. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2013.

MUELLER-KLIESER, W. Multicellular spheroids - a review on cellular aggregates in cancer research. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 113, n. 2, p. 101–122, 1987.

NAPOLITANO, A. P. et al. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. **Tissue engineering**, v. 13, n. 8, p. 2087–2094, 2007.

NEELAMEGHAM, S. et al. Modeling the reversible kinetics of neutrophil aggregation under hydrodynamic shear. **Biophysical journal**, v. 72, n. 4, p. 1527–1540, 1997.

NEELAMEGHAM, S.; MUNN, L. L.; ZYGOURAKIS, K. A model for the kinetics of homotypic cellular aggregation under static conditions. **Biophysical journal**, v. 72, n. 1, p. 51–64, 1997.

NICKERSON, C. A. et al. Three-dimensional tissue assemblies : novel models for the study of *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 7106–7120, 2001.

OKUYAMA, T. et al. Preparation of arrays of cell spheroids and spheroid-monolayer cocultures within a microfluidic device. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 572–576, 2010.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 10, p. 839–845, 2007.

PAPOUTSAKIS, E. T. Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. **Trends in Biotechnology**, v. 9, n. 9, p. 316–324, 1991.

PARK, K. H. et al. Phenotype of hepatocyte spheroids behavior within thermo-sensitive poly(NiPAAm-co-PEG-g-GRGDS) hydrogel as a cell delivery vehicle. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 15, p. 1081–1086, 2005.

PEDERSEN, J. A.; SWARTZ, M. A. Mechanobiology in the third dimension. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 33, n. 11, p. 1469–1490, 2005.

POPLAWSKI, N. J. et al. Adhesion between cells, diffusion of growth factors, and elasticity of the AER produce the paddle shape of the chick limb. **October**, v. 373, p. 521–532, 2007.

RAGHAVAN, S. et al. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16948–16961, 2016.

RESENDE, M. M. et al. Distribution of suspended particles in a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 3, p. 755–761, 2001.

RESNIK, N. et al. Highly selective anti-cancer activity of cholesterol-interacting agents methyl-beta-cyclodextrin and ostreolysin a/pleurotolysin B protein complex on urothelial

cancer cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2015.

RIGBY, C. C.; FRANKS, L. M. A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. **British journal of cancer**, v. 24, n. 4, p. 746–754, 1970.

RODDAY, B. et al. Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 16, n. 9, p. 1119–1124, 2011.

RODRIGUES, C. A. V et al. Stem cell cultivation in bioreactors. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 815–829, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos & otimização de processos. in: 3. Noções sobre experimentos fatoriais. **Carita Editora** 2005. p. 95-123.

SAINI, S.; WICK, T. M. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 510–521, 2003.

SANTIAGO, P. A.; GIORDANO, R. D. C.; SUAZO, C. A. T. Performance of a vortex flow bioreactor for cultivation of CHO-K1 cells on microcarriers. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 35–45, 2011.

SANTO, V. E. et al. Adaptable stirred-tank culture strategies for large scale production of multicellular spheroid-based tumor cell models. **Journal of Biotechnology**, v. 221, p. 118–129, 2016.

SCHROBBACK, K. et al. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 3, p. 649–663, 2012.

SCHWARZ, R. P.; GOODWIN, T. J.; WOLF, D. A. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 14, n. 2, p. 51–57, 1992.

SHENKMAN, R. M. et al. Effects of energy dissipation rate on islets of langerhans: implications for isolation and transplantation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 2, p. 413–423, 2009.

SHOEMAKER, R. H. et al. Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. **Cancer Research**, v. 45, n. 5, p. 2145–2153, 1985.

SINEVIC, V.; KUBOI, R.; NIENOW, A. W. Power numbers, Taylor numbers and Taylor vortices in viscous Newtonian and non-Newtonian fluids. **Chemical Engineering Science**, v. 41, n. 11, p. 2915–2923, 1986.

SINSKEY, A. J. et al. Production of cell-derived products: virus and interferon. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 369, n. 1, p. 47–59, 1981.

SMALLEY, K. S. M.; LIONI, M.; HERLYN, M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 42, n. 8–9, p. 242–247, 2006.

SONG, C. W.; GRIFFIN, R.; PARK, H. J. **Influence of tumor pH on therapeutic response**. [s.l: s.n.]. v. 16

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World cancer report 2014** World Health Organization, 2014. Disponível em: <<http://www.videnza.org/wp-content/uploads/World-Cancer-Report-2014.pdf>>

SUTHERLAND, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. **Science**, v. 240, n. 4849, p. 177–240, 1988.

THURBER, G. M.; WITTRUP, K. D. Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids. **Cancer Research**, v. 68, n. 9, p. 3334–3341, 2008.

TOH, Y. et al. A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels.

Lab on a chip, v. 7, n. 3, p. 302–309, 2007.

TUNG, Y.-C. et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. **The Analyst**, v. 136, n. 3, p. 473–478, 2011.

TUNGGAL, J. K. et al. Penetration of anticancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 1583–1586, 1999.

UNSWORTH, B. R.; LELKES, P. I. Growing tissues in microgravity. **Nature medicine**, v. 4, n. 8, p. 901–907, 1998.

UPRETI, M. et al. Tumor-endothelial cell three-dimensional spheroids: new aspects to enhance radiation and drug therapeutics. **Translational oncology**, v. 4, n. 6, p. 365–376, 2011.

VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 12, n. 1, p. 5–10, 2005.

VIANNA, D. R. et al. 4-Methylcoumarins with cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. **Medicinal Chemical Communications**, v. 6, n. 5, p. 905–911, 2015.

WANG, J.; WAN, W. Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 3, p. 1253–1259, 2009.

WARREN, C. A. et al. Detection of epithelial cell injury and quantification of infection in the HCT8 organoid model of cryptosporidiosis. **Clinical Research**, v. 147, n. 1, p. 39–44, 2009.

WHITTINGTON, P. N.; GEORGE, N. The use of laminar tube flow in the study of hydrodynamic and chemical influences on polymer flocculation of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 4, p. 451–458, 1992.

WILDING, J. L.; BODMER, W. F. Cancer cell lines for drug discovery and development. **Cancer Research**, v. 74, n. 9, p. 2377–2384, 2014.

WILSON, W. R.; HAY, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 6, p. 393–410, 2011.

WONG, H. L. et al. Paclitaxel tumor-priming enhances siRNA delivery and transfection in 3-dimensional tumor cultures. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 833–840, 2011.

WRÓNSKI, S. et al. Mass transfer in gas- liquid Couette -Taylor flow in membrane reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 54, n. 13–14, p. 2963–2967, 1999.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell**, v. 130, n. 4, p. 601–610, 2007.

YU, Y. et al. Comparative lipidomic study of urothelial cancer models: association with urothelial cancer cell invasiveness. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 11, p. 3266–3279, 2016.

ZAJAC, M.; JONES, G. L.; GLAZIER, J. A. Simulating convergent extension by way of anisotropic differential adhesion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 222, n. 2, p. 247–259, 2003.

ZENG, W. et al. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 263–267, 2015.

9 APÊNDICE

9.1 Medição da viscosidade do meio

Variação da viscosidade em função da concentração de dextrana no meio de cultura utilizado em experimento. A Tabela 20 fornece os dados da concentração da dextrana, dos três valores de viscosidade fornecido e o cálculo da viscosidade média e do desvio padrão. A Figura 49 fornece os pontos e a curva característica da variação da viscosidade em função da concentração de dextrana no intervalo em questão. Abaixo da figura está a equação da curva utilizada para o ajuste.

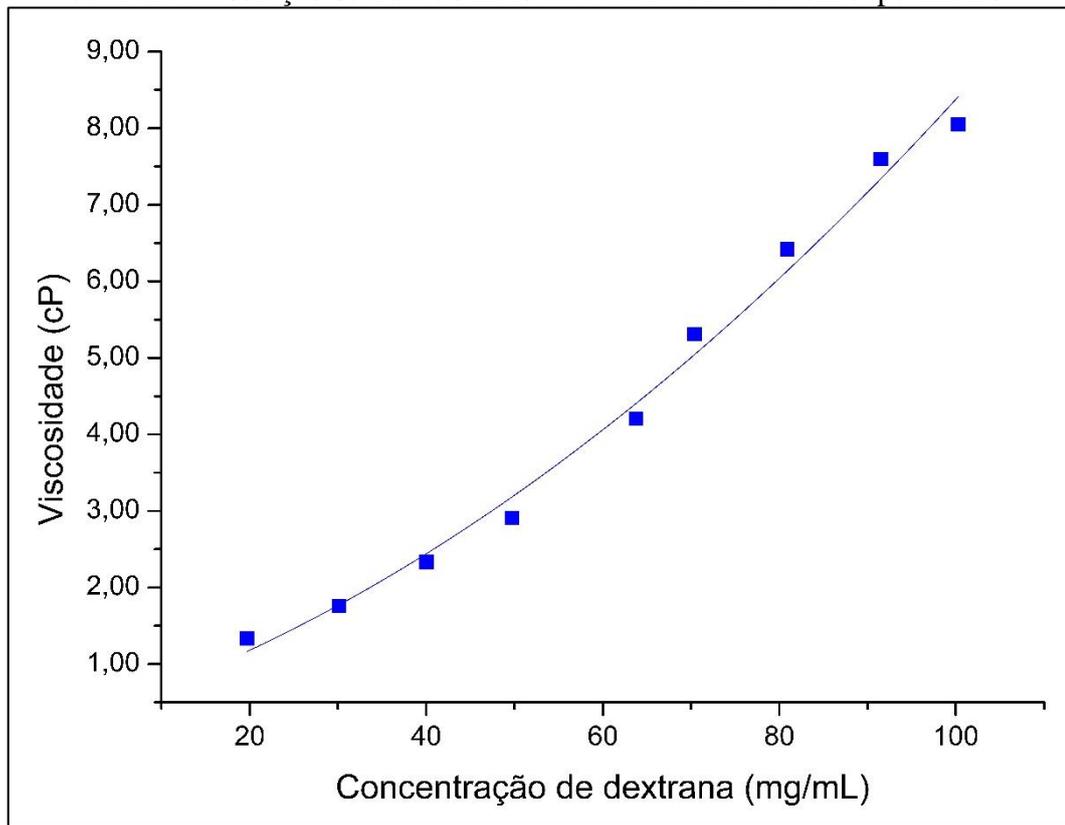
As leituras de viscosidades foram feitas no reômetro (Brookfield, EUA) e o meio se comportou como um fluido Newtoniano.

Tabela 20 – Dados de leituras das viscosidades de meio de cultura quando há adição de dextrana, cálculo da viscosidade média e do desvio padrão amostral.

C_{dex} (mg/mL)	μ_{f1}	μ_{f2}	μ_{f3}	$\mu_{f\text{méd}}\text{io}$	Desvio padrão
19,71	1,37	1,42	1,21	1,3	0,1
30,15	1,83	1,73	1,72	1,76	0,06
40,05	1,99	3,11	1,90	2,3	0,7
49,71	3,03	2,92	2,77	2,9	0,1
63,82	4,45	3,97	4,20	4,2	0,2
70,39	5,42	5,20	5,30	5,3	0,1
80,95	6,56	6,41	6,29	6,4	0,1
91,51	7,77	7,15	7,87	7,6	0,4
100,26	8,15	8,18	7,81	8,0	0,2

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 49 – Curva característica da variação da viscosidade em função da concentração de dextrana. A solução se trata do meio de cultura utilizada em experimento.



Fonte: Acervo pessoal.

A equação da curva ajustada é de um polinômio de segundo grau.

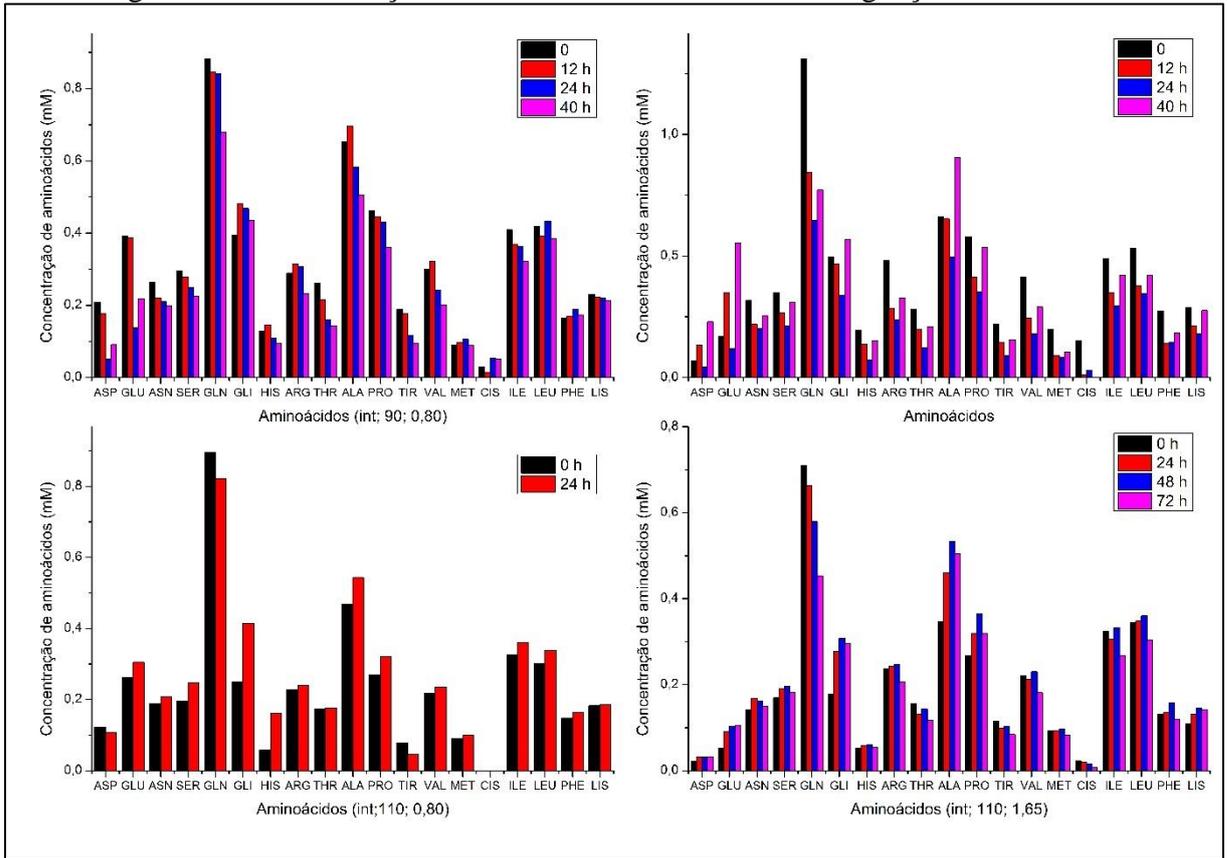
$$\mu_f = 0,2812 + 0,036 \cdot C_{dex} + 4,49576 \cdot 10^{-4} C_{dex}^2$$

$$R^2 = 0,98695$$

9.2 Gráficos completos dos aminoácidos

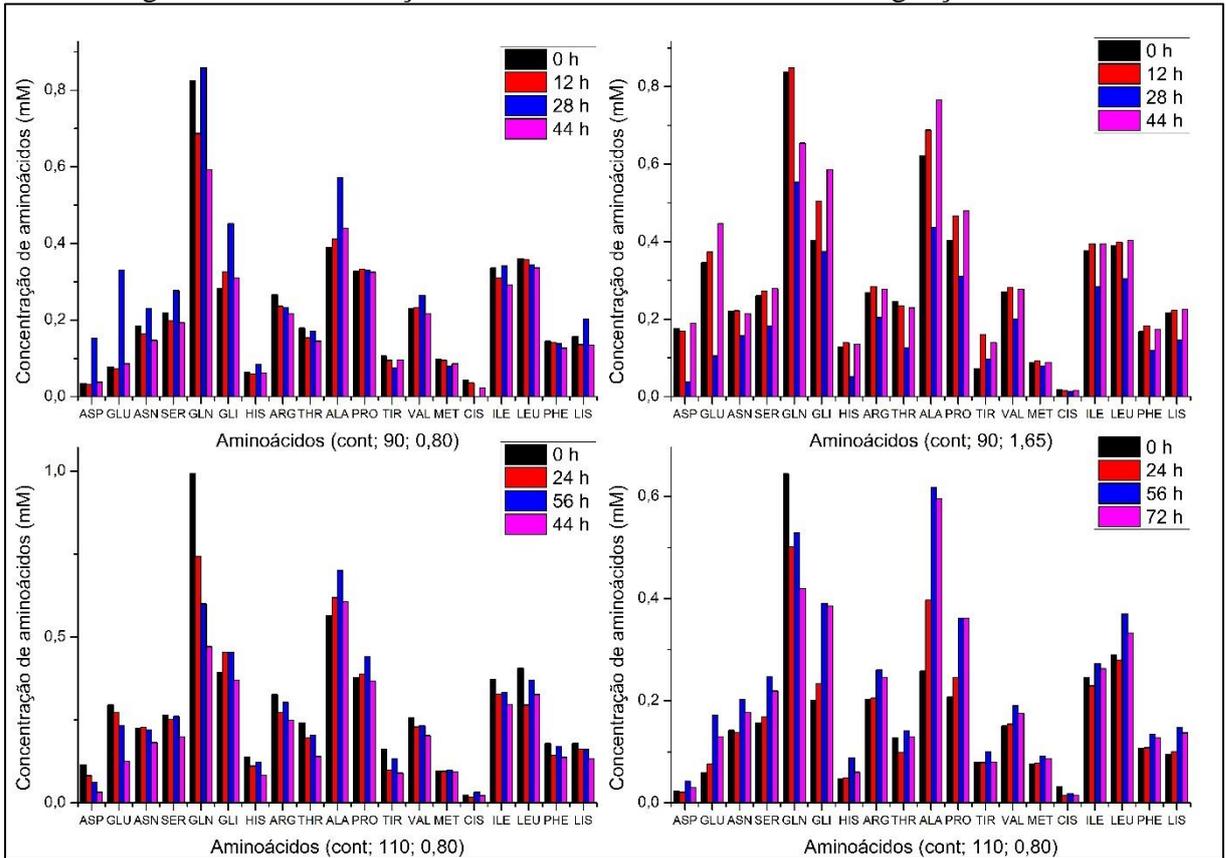
A Figura 50 e a Figura 51 ilustram, respectivamente, as concentrações de aminoácidos durante o cultivo com a metodologia de agitação intermitente e com agitação contínua.

Figura 50 – Concentração de aminoácidos em cultivos de agitação intermitente.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 51 – Concentração de aminoácidos com cultivos de agitação contínua.



Fonte: Acervo pessoal