

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

DIOGO PERES DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS TUMORAIS DE
CÂNCER DE BEXIGA NUM BIORREATOR DE VÓRTICE DE TAYLOR**

São Carlos
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

DIOGO PERES DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS TUMORAIS DE
CÂNCER DE BEXIGA NUM BIORREATOR DE VÓRTICE DE TAYLOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química para obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

Orientação: Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo.

São Carlos
2018

[VERSO DA FOLHA DE ROSTO]

Ficha catalográfica

DIOGO PERES DOS SANTOS

PRODUÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS TUMORAIS DE CÂNCER DE
BEXIGA NUM BIORREATOR DE VÓRTICE DE TAYLOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Pesquisa e desenvolvimento de processos químicos. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 8 de março de 2018

Orientador

Dr. Claudio Alberto Torres Suazo
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Examinadora

Dr.^a. Fernanda Perpétua Casciotori
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Examinadora

Dr.^a. Kamilla Swiech Antonietto
Universidade de São Paulo – USP

Examinador

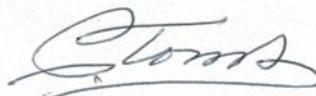
Dr. Marcel Otavio Cerri
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Examinador

Dr. Ricardo Carneiro Borra
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE DIOGO PERES DOS SANTOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 08 DE MARÇO DE 2018.

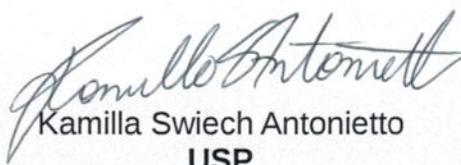
BANCA EXAMINADORA:



Claudio Alberto Torres Suazo
Orientador, UFSCar



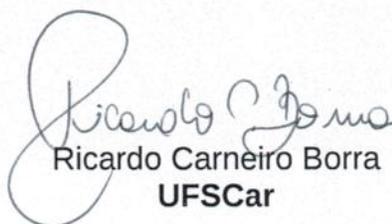
Fernanda Perpétua Casciotori
UFSCar



Kamilla Swiech Antonietto
USP



Marcel Otávio Cerri
UNESP



Ricardo Carneiro Borra
UFSCar

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores e pesquisadoras que se esforçam para ampliar os limites do conhecimento nas mais diversas áreas

AGRADECIMENTO

À minha mãe, Leonilda Rosa de Oliveira, pela confiança na minha capacidade de superar as dificuldades impostas.

Ao meu pai, José Domingos Peres dos Santos, por sempre confiar que eu poderia melhorar mais e me superar.

Ao meu irmão, Daniel Peres dos Santos, por ser um exemplo de coragem em frente aos desafios da vida.

Ao Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo, pela confiança na minha capacidade e suporte constante durante todo o período da pós-graduação.

Aos colegas de laboratório, Eric Takashi Katayama, Genoveva Flores Luna, Juliana de Sá da Silva, Monize Caiado Decarli, Rebeca Cordellini Emídio e Viviana Gonzalez Gil pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos, próximos ou distantes, pela torcida.

À minha namorada, Julia Villela Berlingeri, pelo apoio e afeto que me fortaleceu.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Cultivo de células bidimensional (2D) tem sido a plataforma comum para avaliar fármacos anticâncer. No entanto, cultivo tridimensional (3D) de células, como o de esferoides de tumor multicelular (MCTS), se assemelham melhor as propriedades do tumor *in vivo*, sendo potencialmente mais apropriados para a avaliação pré-clínica de candidatos a fármacos. No entanto, essa mudança de 2D para 3D na plataforma de testes da triagem de alto rendimento só será possível se a produção em massa desse cultivo se tornar possível. Este estudo objetiva avaliar um novo biorreator de vórtice de Taylor (TVB) para produção de MCTS usando a linhagem de células de câncer de bexiga RT4. Para uma análise robusta, foi realizado um estudo preliminar mediante planejamento fatorial completo das variáveis independentes agitação e densidade do inóculo, resultando em 4 combinações e um ponto central. Com os resultados obtidos foi possível fazer um delineamento composto central mais dirigido das duas variáveis, resultando em 9 combinações diferentes e uma triplicata no ponto central. As variáveis respostas analisadas com relação aos esferoides produzidos foram: diâmetro médio, desvio padrão desse diâmetro, quantidade (número), produtividade, e circularidade. Os cultivos foram realizados num TVB com volume útil de 100 mL utilizando meio McCoy 5A numa incubadora a 37 °C e 5-10% de CO₂. Os resultados permitiram a identificação de valores das duas variáveis independentes que conduzem a crescimentos celulares com baixa letalidade, alta produtividade de esferoides e uma ampla faixa de diâmetros que poderão atender diversas demandas tecnológicas na avaliação da eficácia e toxicidade de fármacos. A circularidade e a variabilidade do diâmetro dos esferoides, apesar de serem consideradas boas, precisam ser melhoradas para novas aplicações tecnológicas na medicina e farmácia. Em resumo, pode-se afirmar que a utilização do TVB para produção de MCTS em larga escala é uma plataforma muito promissora.

Palavras-chave: Cultivo de células em 3D; Delineamento experimental; Biorreator de vórtice de Taylor; RT4; Esferoide de tumor multicelular.

ABSTRACT

Two-dimensional (2D) cell culture has been the common platform for evaluating anticancer drugs. However, three-dimensional (3D) cell cultures, such as multicellular tumor spheroids (MCTS), best resemble tumor *in vivo* properties, being potentially more suitable for preclinical evaluation of drug candidates. However, this shift from 2D to 3D on the high-throughput screening platform will only be possible if mass production of this culture becomes possible. This study aims to evaluate a new Taylor vortex bioreactor (TVB) for the production of MCTS using the RT4 bladder cancer cell line. For a robust analysis, a preliminary study was carried out by full factorial design of the independent variables agitation and inoculum density, resulting in 4 combinations and a central point. With the results obtained it was possible to make a more directed central composite design of the two variables, resulting in 9 different combinations and a triplicate in the central point. The response variables analyzed related to the spheroids produced were: mean diameter, standard deviation of this diameter, quantity (number), productivity, and circularity. Cultures were performed on a TVB with a working volume of 100 mL using McCoy 5A medium in a 37 °C incubator and 5-10% CO₂. The results allowed the identification of values of the two independent variables that lead to cell growth with low lethality, high spheroid productivity and a wide range of diameters that could meet several technological demands in the evaluation of drug efficacy and toxicity. The circularity and variability of spheroid diameter, although considered good, need to be improved for new technological applications in medicine and pharmacy. In summary, it can be said that the use of TVB for the production of large-scale MCTS is a very promising platform.

Keywords: 3D cell culture; Experimental design; Taylor vortex bioreactor; RT4; Multicellular tumor spheroid

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo padrão de desenvolvimento de um fármaco pela indústria farmacêutica..19
- Figura 2.** Métodos mais comuns de formação de esferoides e diferenças com relação ao cultivo tradicional. (A) cultivo tradicional em duas dimensões. (B) formação de esferoides pelo revestimento de superfícies com película de baixa adesão. (C) formação de esferoides com a metodologia da gota invertida aderida a uma superfície sólida.....26
- Figura 3.** Modelo representativo comum das diferentes zonas celulares e perfil de concentração de nutrientes e metabólitos presentes em um esferoide multicelular.....28
- Figura 4.** Diagrama esquemático do biorreator tipo tanque agitado (A) e do biorreator frasco spinner (B) com dois tipos comuns de impelidores.....29
- Figura 5.** Diagrama esquemático de dois tipos de biorreator RWV. (A) Reservatório de alta razão de aspecto (HARV, high aspect ratio vessel), volumes disponíveis de 1 à 50 mL. (B) Reservatório lateral de rotação lenta (STLV, slow turning lateral vessel), volumes disponíveis de 55 à 500 mL.....31
- Figura 6.** Análise da influência do ambiente na arquitetura de um esferoide já formado. Esferoides formados após 6 semanas de cultivo em RWV foram transferidos para placas de cultivo planas ou mantidos no biorreator por mais 7 dias. (A) Na placa estática, houve desintegração do esferoide pela mudança de ambiente. (B) No RWV, esferoides permaneceram intactos.....31
- Figura 7.** Padrões de fluxo formados à medida que se aumenta a rotação do cilindro interno num fluido entre dois cilindros concêntricos.....33
- Figura 8.** Esquema do TVB utilizado. Portas de entrada e saída de ar possuem filtros de ar de 0,22 μm permitindo uma aeração livres de bolhas pelo ar só entrar em contato com o meio através da membrana de silicone ou pelo contato na superfície do líquido.....37
- Figura 9.** Fotos do TVB confeccionado no LATECC. (T) indica as peças confeccionadas com politetrafluoretileno (comercialmente conhecido como teflon). (A) indica o revestimento de aço para a tampa. (V) indica o recipiente e tubo confeccionados com vidro. (S) indica a membrana de silicone.....38
- Figura 10.** Esquema da construção de um planejamento fatorial do tipo FC e DCCR indicando os níveis dos fatores (variáveis independentes).....39
- Figura 11.** Esquema simplificado dos cultivos realizados neste estudo.....41

Figura 12. Resultados obtidos do cultivo em placa de 12 poços com células RT4 realizado em duplicata com inóculo de 2×10^4 células/cm ² em um volume de 700 μ L de meio McCoy 5A.	48
Figura 13. Resultados do nível de pH dos cinco experimentos do grupo inicial. Agitação variou de 85 rpm até 110 rpm e o inóculo inicial de $2,44 \times 10^5$ até $4,56 \times 10^5$ células/mL. O volume de meio McCoy 5A utilizado foi de 100 mL.....	51
Figura 14. Fotos dos esferoides formados para cada um dos experimentos do FC, seus níveis de agitação, inóculo e os valores médios \pm desvio padrão dos diâmetros.....	51
Figura 15. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina da triplicata do ponto central do grupo de DCCR. Agitação constante a 90 rpm e inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.....	55
Figura 16. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 120 rpm e inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. (B) Agitação constante a 60 rpm e inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.....	56
Figura 17. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 90 rpm e inóculo de 10×10^5 células/mL. (B) Agitação constante a 90 rpm e inóculo de 1×10^5 células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.....	56
Figura 18. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 111 rpm e inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL. (B) Agitação constante a 111 rpm e inóculo de $2,3 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.....	57
Figura 19. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 69 rpm e inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL. (B) Agitação constante a 69 rpm e inóculo de $2,3 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.....	58
Figura 20. Valores de número de células obtidos com contagem do número de células dissociadas viáveis (NCDV) e número de células estimados (NCS) pelo uso do Y_x/gli . (A) 69	

rpm, $8,7 \times 10^5$ células/mL. (B) 60 rpm, $5,5 \times 10^5$ células/mL. (C) 60 rpm, $2,3 \times 10^5$ células/mL. (D) 90 rpm, 10×10^5 células/mL. (E) 90 rpm, $5,5 \times 10^5$ células/mL. (F) 90 rpm, 1×10^5 células/mL. (G) 111 rpm, $8,7 \times 10^5$ células/mL. (H) 120 rpm, $5,5 \times 10^5$ células/mL. (I) 111 rpm, $2,3 \times 10^5$ células/mL.....	60
Figura 21. Superfície ajustada da variação do diâmetro médio com 24 horas de cultivo.....	64
Figura 22. Superfície ajustada da variação da produtividade com 24 horas de cultivo.....	65
Figura 23. Superfície ajustada da variação do diâmetro médio final (estabilizado depois de 72 horas de cultivo).....	65
Figura 24. Superfície ajustada da variação da produtividade com 72 horas de cultivo.....	66
Figura 25. Fotos dos esferoides em formação para cada experimento com 24 horas de cultivo, seus níveis de agitação, inóculo, valores médios \pm desvio padrão dos diâmetros.....	67
Figura 26. Fotos dos esferoides formados para cada experimento com 168 horas de cultivo, seus níveis de agitação, inóculo, valores médios \pm desvio padrão dos diâmetros.....	68
Figura 27. Fotos dos microesferoides formados para cada experimento com 168 horas de cultivo, seus níveis de agitação e inóculo.....	68
Figura 28. Imagens obtidas dos cortes de esferoides. A, B e C são originárias do mesmo esferoide, os cortes têm aproximadamente 1 mm de diâmetro, mas são de diferentes alturas do esferoide. D mostra um corte que de 0,7 mm de diâmetro, E tem 1,4 mm de diâmetro. Na F pode-se ver as diferenças nas fisionomias das células à medida que se afastam da superfície do esferoide, a seta indica uma das células que apresentam degeneração hidrópica.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes testados no planejamento FC.....	40
Tabela 2. Níveis das variáveis independentes testados no planejamento DCCR.....	40
Tabela 3. Consumo das principais fontes de energia no cultivo estático.....	49
Tabela 4. Valores calculados para o número de Reynolds e tensão de cisalhamento máxima para cada nível de agitação usado (cálculo baseado nas fórmulas apresentadas no 4.7).....	50
Tabela 5. Resultados obtidos do primeiro grupo de experimentos no TVB, todos os dados foram obtidos nas amostras finais de cada experimento com duração de 72 horas.....	52
Tabela 6. Valores dos coeficientes lineares de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do FC. Os valores estão apresentados com seu valor-p calculado. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. Coef = coeficiente.....	53
Tabela 7. Consumo dos principais substratos pela célula RT4 nos 11 cultivos do DCCR.....	58
Tabela 8. Velocidade específica de crescimento da célula RT4 nos 11 cultivos do DCCR....	60
Tabela 9. Resultados do grupo de experimentos do DCCR com 24 horas de cultivo.....	61
Tabela 10. Valores dos coeficientes lineares e quadráticos de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do DCCR com 24 horas de cultivo. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. L = coeficiente linear. Q = coeficiente quadrático. Coef = coeficiente.....	61
Tabela 11. Resultados do grupo de experimentos do DCCR ao final de 168 horas de cultivo.	62
Tabela 12. Valores dos coeficientes lineares e quadráticos de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do DCCR com 168 horas de cultivo. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. L = coeficiente linear. Q = coeficiente quadrático. Coef = coeficiente.....	62
Tabela 13. Resultados da produtividade do grupo de experimentos do DCCR as 24 e 72 horas de cultivo. Prod.= Produtividade.....	63
Tabela 14. Valores dos coeficientes lineares e quadráticos de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do DCCR. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. L = coeficiente linear. Q = coeficiente quadrático. Coef = coeficiente. Prod.= Produtividade.....	64
Tabela 15. Análise de custo por esferoide de aproximadamente 250 μm de diâmetro do biorreator deste estudo contra plataformas disponíveis no mercado atual.....	71

Tabela 16. Resultados obtidos do cultivo estático de RT4 em meio McCoy 5A realizado em duplicata.....	80
Tabela 17. Resultados obtidos do cultivo estático de RT4 em meio McCoy 5A realizado em duplicata.....	80
Tabela 18. Concentrações dos dois principais nutrientes e principal metabólito nos 11 casos do DCCR.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de cultura modelo americana (<i>American Type Culture Collection</i>)
CCD	Delineamento central composto (<i>Central composite design</i>)
CHO	Células do ovário de hamster chinês (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLS	Crescimento logístico simulado
Coef.	Coefficiente
CSC	Células-tronco tumorais (<i>cancer stem cells</i>)
CTOS	Esferas originárias de tecido de câncer (<i>cancer tissue-originated spheres</i>)
DCCR	Delineamento central composto rotacional
DEQ	Departamento de Engenharia Química
FC	Fatorial completo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	Administração Federal de alimentos e drogas dos Estados Unidos da América (<i>Food and Drug Administration</i>)
g	Gramma
GEMs	Modelos modificados geneticamente (<i>genetically modified models</i>)
h	Hora
HARV	Sistemas de cultivo celular rotativo (<i>high aspect ratio vessel</i>)
HTS	Triagem de alto rendimento (<i>high throughput screening</i>)
L	Litro
<i>L</i>	Linear
LATECC	Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares
Ln	Logaritmo natural
MBS	Sistema bioanalítico multiparâmetro (<i>Multiparameter Bionanalytical System</i>)
MCTS	Esferoide de tumor multicelular (<i>Multicellular tumor spheroid</i>)
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MWVF	Fluxo de vórtice ondulado modulado (<i>Modulated Wavy Vortex Flow</i>)

NASA	Administração Aeronáutica e Espacial Nacional dos Estados Unidos da América (<i>National Aeronautics and Space Administration</i>)
NCDV	Número de células dissociadas viáveis
NCS	Número de células estimados
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Esferoides multicelulares organotípicos (<i>organotypic multicellular spheroids</i>)
PPGEQ	Programa de pós-graduação em engenharia química
Prod.	Produtividade
PTFE	Politetrafluoretileno, comercialmente conhecido como teflon
Q	Quadrático
RCCS	Sistemas de cultivo celular rotativo
RWV	Biorreator de paredes rotativas (<i>rotating wall vessel</i>)
STLV	Reservatório lateral de rotação lenta (<i>slow turning lateral vessel</i>)
STR	Biorreator de tanque agitado (<i>stirred tank bioreactor</i>)
t	Tempo
TVB	Biorreator de vórtice de Taylor (<i>Taylor Vortex Bioreactor</i>)
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
ULA	Adesão ultrabaixa (<i>Ultra low attachment</i>)
USP	Universidade de São Paulo
VP	Valor previsto
v/v	Volume/volume
WVF	Fluxo de vórtice ondulado (<i>Wavy Vortex Flow</i>)
YSI	Yellow Springs Instruments

LISTA DE VARIÁVEIS

A	Coefficiente de efeito da agitação (unidade variável)
A	Agitação, velocidade de rotação no biorreator (rpm)
AI	Coefficiente de efeito conjunto da agitação e inóculo (unidade variável)
AL	Coefficiente linear de efeito da agitação (unidade variável)
C_i	Circularidade (%)
CV	Coefficiente de variação (%)
d	Distância entre os cilindros interno e externo do TVB (m)
DM	Diâmetro médio (mm)
DM_F	Diâmetro médio final (mm)
ε	Dissipação de energia (W/kg)
η	Razão entre cilindro interno e externo do TVB (-)
G	Torque adimensional (-)
γ	Taxa de cisalhamento (s^{-1})
H	Altura do fluido no TVB (m)
I	Coefficiente de efeito do inóculo (unidade variável)
I	Densidade de inóculo colocado no biorreator (células/mL)
IL	Coefficiente linear de efeito do inóculo (unidade variável)
IQ	Coefficiente quadrático de efeito do inóculo (unidade variável)
IT	Intercepto/Média (unidade variável)
k	Constante de declividade da curva de crescimento logístico (h^{-1})
μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
μ_v	Viscosidade do fluido ($kg/m \cdot s$)
N_A	Nível de agitação (-)
N_I	Nível de inóculo (-)
N_x	Número de células viáveis (células)
n_{gli}	Quantidade de glicose (mmol)
n_{nut}	Quantidade de nutriente (mmol)
Ω	Velocidade de rotação do cilindro interno do TVB (rad/s)
q_{nut}	Consumo específico de nutriente (mmol/células \cdot h)
Re	Número de Reynolds (-)
R_e	Raio do cilindro externo do TVB (m)
ρ	Densidade do fluido (kg/m^3)

R_i	Raio do cilindro interno do TVB (m)
T	Torque (N·m)
τ_{\max}	Tensão máxima de cisalhamento (Pa)
t_c	Tempo no ponto médio da curva sigmoide de crescimento logístico (h)
V	Volume do fluido entre os cilindros no biorreator de vórtice de Taylor (m ³)
ν	Viscosidade cinemática do fluido (m ² /s)
$Y_{x/gli}$	Fator de rendimento celular em glicose (células/mmol)

SUMÁRIO

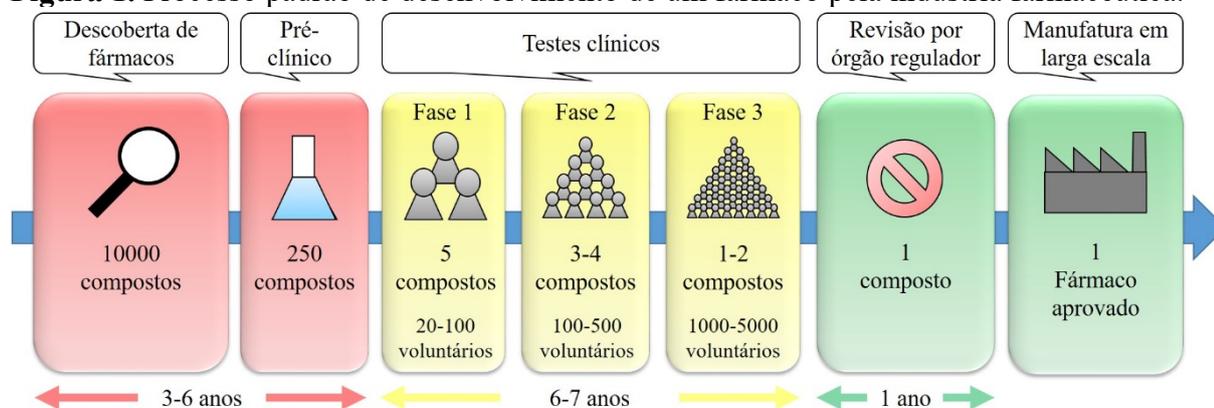
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 GERAL.....	23
2.2 ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 CÂNCER DE BEXIGA E LINHAGEM RT4.....	24
3.2 TESTES DE FÁRMACOS E CULTIVO DE CÉLULAS.....	25
3.3 BIORRETORES PARA CULTIVOS DE CÉLULAS.....	28
3.4 COMENTÁRIOS FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 LINHAGEM DE CÉLULAS E MEIO DE CULTURA.....	37
4.2 FORMAÇÃO DO BANCO DE CÉLULAS E EXPERIMENTO 2D.....	37
4.3 BIORREATOR DE VÓRTICE DE TAYLOR.....	38
4.4 METODOLOGIA DE EXPERIMENTO DE CULTIVO NO TVB.....	40
4.5 METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	42
4.5.1 ANÁLISE DE PH E DENSIDADE CELULAR.....	42
4.5.2 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, LACTATO E AMINOÁCIDOS.....	43
4.5.3 ANÁLISE DOS ESFEROIDES.....	43
4.5.4 ANÁLISE DE MORFOLOGIA POR CORTES HISTOLÓGICOS.....	44
4.6 CÁLCULOS DE VARIÁVEIS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	44
4.7 CÁLCULO DA TENSÃO DE CISALHAMENTO MÁXIMA.....	46
4.8 CÁLCULOS ESTATÍSTICOS.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 EXPERIMENTO PRELIMINAR 2D.....	49
5.2 GRUPO INICIAL DE EXPERIMENTOS PARA FORMAÇÃO DE ESFEROIDES NO TVB E CÁLCULOS DE PARÂMETROS DO BIORREATOR.....	50
5.2.1 VALORES DA TENSÃO DE CISALHAMENTO.....	51
5.2.2 GRUPO DE EXPERIMENTOS PARA O FC.....	51

<u>5.3 GRUPO DE EXPERIMENTOS PARA O DCCR.....</u>	<u>55</u>
<u>5.3.1 ANÁLISE DO CULTIVO NO TVB.....</u>	<u>55</u>
<u>5.3.2 ANÁLISE DO EFEITO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.....</u>	<u>62</u>
<u>5.4 CULTIVO ADICIONAL E IMAGENS DE CORTES HISTOLÓGICOS.....</u>	<u>70</u>
<u>5.5 COMPARAÇÃO COM PLATAFORMAS COMERCIAIS.....</u>	<u>71</u>
<u>6 CONCLUSÕES.....</u>	<u>73</u>
<u>6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</u>	<u>73</u>
<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>74</u>
<u>APÊNDICE.....</u>	<u>80</u>
<u>ANEXO.....</u>	<u>82</u>

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos para serem usados em tratamentos inovadores para diversas doenças têm sido o pilar central para os avanços na saúde humana, tendo duplicado o gasto em pesquisa desses compostos entre 2004 e 2014 (HAY et al., 2014). No entanto, estatísticas refletem um alto índice de reprovação de compostos candidatos a fármacos nos diversos estágios de desenvolvimento do fármaco, uma vez que somente 1 a cada 10000 chegam ao mercado após mais de uma década de desenvolvimento, como se mostra na Figura 1. Uma abordagem muito utilizada e consolidada pela tecnologia de cultivo de células animais é o uso de ensaios celulares para a seleção de candidatos a fármacos, melhorando assim a qualidade dos compostos usados na avaliação clínica (EGLÉN; RANDLE, 2015). Esses ensaios consistem no cultivo de células em superfícies rígidas, sendo comum o uso de frascos ou placas de poliestireno com superfícies especialmente tratadas para possibilitar a adesão e a proliferação celular. Devido a forma 2D de crescimento, essa tecnologia é conhecida como cultivo em monocamada (HOARAU-VÉCHOT et al., 2018).

Figura 1. Processo padrão de desenvolvimento de um fármaco pela indústria farmacêutica.



Fonte: Adaptado de TOKENS (2005); HAY et al. (2014)

Porém, o cultivo tradicional em monocamada vem sendo considerado inadequado para comprovar a eficácia de novos fármacos, especialmente aqueles destinados a agir em células tumorais, devido à falta de interações célula-célula e célula-matriz neste tipo de cultivo, sendo

essas interações determinantes de diferenças comportamentais de grande relevância entre células em cultivo e células *in vivo* (SANT; JOHNSTON, 2017). Ao contrário do cultivo tradicional, o cultivo 3D no formato de esferoides mimetiza de forma mais apropriada o contexto celular e os gradientes patofisiológicos terapeuticamente relevantes de tumores *in vivo*. Esse novo tipo de cultivo tem o potencial de contribuir para a eliminação de candidatos fracos no estágio pré-animal e pré-clínico, além de identificar fármacos promissores que poderiam falhar no ensaio celular 2D clássico pouco representativo do tumor (HIRSCHHAEUSER et al., 2010)

O uso de esferoides no descobrimento de drogas implica na produção de milhares de esferoides. Para atender uma demanda tão alta há necessidade de equipamentos e procedimentos de alta performance, para conseguir produzir em grandes quantidades, com tamanho uniforme e de maneira eficiente em termos de tempo e custo. Vários métodos de produção vêm sendo sugeridos, podendo ser separados em dois tipos: (a) cultivo de células suspensas em recipientes agitados; (b) cultivo em superfícies não aderentes; e (c) união forçada pela força da gravidade em gotas suspensas (MEHESZ et al., 2011). Porém, nenhum destes métodos em suas plataformas iniciais atenderam o critério de possibilidade de aumento de escala, devido a forma e tamanho não serem controláveis ou pela plataforma não permitir a produção de grandes quantidades de uma maneira eficiente, sendo necessário a melhoria destas plataformas (LIN; CHANG, 2008). Entre as abordagens baseadas na agitação para a formação de esferoides estão inclusos os recipientes giratórios, sistemas de paredes rotativas e sistemas de cultivos em suspensão agitada. Nessas abordagens dinâmicas, forças hidrodinâmicas geradas pela agitação no cultivo celular promovem interações entre as células, resultando na agregação celular (HICKMAN et al., 2014). Sendo o controle da velocidade de agitação e da quantidade de células presentes na suspensão, a forma mais efetiva relatada de controlar o processo de agregação celular, permitindo assim o controle do esferoide formado (HUNT et al., 2014; LIN; CHANG, 2008).

Tendo em vista esta atual demanda por pesquisa em produção de grandes quantidades de esferoides em diferentes plataformas, visando a melhoria do processo de seleção de novos fármacos, este trabalho avalia uma alternativa ainda não explorada na literatura para a formação de esferoides. O sistema escolhido foi o biorreator de vórtice de Taylor (TVB – *Taylor vortex bioreactor*), um sistema de fácil aumento de escala e conhecido pela sua

capacidade de promover uma agitação não turbulenta e tensão de cisalhamento praticamente homogênea em todo o volume de trabalho (SORG et al., 2011).

Mundialmente, o câncer de bexiga é o décimo primeiro mais comum tipo de câncer, sendo estimado 429 mil novos casos e um total de 165 mil óbitos por ano nos dados mais recentes. Entre os pacientes diagnosticados com câncer de bexiga, aproximadamente 75% é do tipo não invasivo (BABJUK et al., 2016; FERLAY et al., 2015). Sendo esta enfermidade um problema de saúde pública de alta relevância devido a sua prevalência, mortalidade, efeito na qualidade de vida para os indivíduos enfermos e seus familiares, além do seu alto impacto econômico (KLOTZ; BRAUSI, 2015). Sendo considerado o câncer com um dos maiores custos de tratamento desde o diagnóstico até a morte, isso se deve em parte pela alta incidência do tipo não invasivo, que é associado a uma elevada probabilidade de recorrência ao longo da vida (de 60 à 70%), o que torna necessário cistoscopia e citologia frequentes, além de eventual quimioterapia intravesical ou tratamento com imunoterapia (LERNER; ROBERTSON, 2016). Tendo em vista esse cenário, foi escolhida a linhagem de células RT4 como modelo de célula tumoral neste estudo para iniciar a pesquisa na geração de esferoides, sendo esta linhagem proveniente de um câncer de bexiga, mais especificamente de um carcinoma de células de transição. Esta linhagem é utilizada com regularidade na pesquisa por novos fármacos ou na busca por maior esclarecimento dos mecanismos deste câncer de bexiga não invasivo (TSUI et al., 2015; VALLO et al., 2015).

Neste trabalho será verificado o potencial de um modelo de TVB projetado e construído no LATECC para a produção massiva e eficiente de esferoides multicelulares com características apropriadas para possibilitar seu uso futuro na avaliação da eficácia de candidatos a novos fármacos com ação em células tumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar, como prova de princípio, a capacidade de um TVB de produzir, com alta produtividade e baixo custo, esferoides multicelulares de células tumorais RT4 com características geométricas apropriadas para uso na avaliação de eficácia de fármacos.

2.2 Específicos

a) Quantificar a importância e os efeitos das variáveis mais relevantes no processo de agregação da linhagem celular RT4 no TVB para formação de esferoides.

b) Sugerir procedimentos para produzir no TVB diferentes tipos de esferoides visando atender necessidades atuais específicas existentes, diâmetro inferior a 0,5 mm e alta quantidade, no campo de avaliação de fármacos sob o conceito HTS (*High Throughput Screening*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão foi dividida em três partes para elucidar aspectos importantes do tema da tese. A primeira parte é sobre o câncer de bexiga e as células escolhidas como linhagem modelo desta enfermidade. A segunda parte é sobre os testes de fármacos *in vitro* e como os cultivos 3D se localizam dentro dessa área. A terceira parte é sobre o uso de biorreatores na produção de esferoides, elucidando o motivo do TVB ser considerado uma alternativa viável.

3.1 Câncer de Bexiga e linhagem RT4

Câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes relacionadas a esta enfermidade em 2012, afetando populações de todos os países. Em 2008, o número de novos casos registrados correspondeu a 12,7 milhões, demonstrando uma taxa de crescimento que se mantida, resultará em 25 milhões ao passar de duas décadas. No Brasil, para o biênio 2018-2019 foi estimado um número de 10 mil novos casos para cada ano (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017). O ônus crescente do câncer gera uma grande preocupação nos sistemas de saúde de países em desenvolvimento, especialmente devido aos custos acentuados do tratamento desta enfermidade (FERLAY et al., 2015). Aproximadamente de 70-80% dos pacientes são diagnosticados com tumores de baixo grau e não invasivo. Apesar do avanço na diagnose e terapia, a probabilidade de recorrência e progressão para tumores crescentes invasivos deve ser reconhecida. De 50 até 70% dos tumores recorrem e aproximadamente 20% progridem para o tipo músculo invasivo. Somente de 30 a 40% dos pacientes com câncer músculo invasivo sobrevivem por 5 anos ou mais (KLOTZ; BRAUSI, 2015).

Tendo em vista a necessidade de entender mais sobre essa enfermidade, cientistas utilizaram de técnicas de cultivo de tecidos, que são inestimáveis para o estudo de processos biológicos em nível celular. Porém nem todas as células de tumores humanos podiam ser mantidas facilmente em cultivo após serem removidas do paciente, assim afetando a

capacidade da pesquisa enquanto não estivesse disponível linhagens estáveis de diferentes células tumorais. Uma das primeiras linhagens de tumores do trato urinário que apresentou capacidade de ser mantida por tempo indefinido em cultivo estático foi a linhagem RT4. Esta foi derivada de células obtidas de um tecido de aparência histológica de um carcinoma de células de transição diferenciadas, obtido de um paciente do sexo masculino de 63 anos, que devido à recorrência do tumor, teve toda a bexiga urinária removida em cirurgia (RIGBY; FRANKS, 1970). As células de câncer de carcinoma urotelial que as RT4 representam são as mais relevantes para o tratamento do câncer de bexiga urinária, pois esse tipo celular compõe aproximadamente 90% dos tumores de bexiga encontrados, sendo os únicos tumores de bexiga tratados localmente (YU et al., 2016). Apesar de outras linhagens terem sido estabelecidas, as células RT4 continuaram servindo como modelo para a pesquisa do câncer de bexiga, auxiliando diversas áreas, como na pesquisa por genes alvos para novas terapias (TSUI et al., 2015) ou estudo com quimioterápicos para entender a resistência adquirida por alguns pacientes (VALLO et al., 2015).

3.2 Testes de fármacos e cultivo de células

Civilizações antigas dependiam da observação médica para identificar ervas, drogas e terapias que poderiam ser utilizadas em tratamento. No início do século XX, terapeutas em diversos lugares começaram a desenvolver o conceito de ensaio de drogas terapêuticas “bem controlado”. Este conceito incluiu, por exemplo, análises laboratoriais seguidas de estudo clínico. Em 1938, uma lei de alimentos, drogas e cosméticos dos Estados Unidos submeteu novos medicamentos à avaliação de segurança pré-comercializada pela primeira vez. Isso requeria que os reguladores da FDA (*Food and Drug Administration*, Administração Federal de alimentos e drogas dos Estados Unidos da América) revisassem os resultados dos testes pré-clínicos e clínicos de novos fármacos. Embora a lei não especificasse os tipos de testes que eram necessários para a aprovação, a nova autoridade permitiu que os oficiais bloqueassem a comercialização de um novo medicamento formalmente ou a atrasassem, exigindo dados adicionais. A lei também deu aos reguladores poderes limitados de negociação sobre o estudo científico e requisitos de aprovação com a indústria farmacêutica e da profissão médica.

Um desastre mundial, decorrente do uso da talidomida por mulheres grávidas em 1961, resultou na promulgação da emenda aos fármacos em 1962, que declarou explicitamente que o FDA confiaria em testes científicos e que as novas aprovações de drogas seriam baseadas não só em demonstração de segurança, mas também em “evidência substancial” de eficácia de uma droga. Desde 1962, a FDA tem realizado refinamentos substanciais à ampla exigência legal de que os novos medicamentos pós-1962 sejam aprovados com base em estudos “adequados e bem controlados” (JUNOD, 2016). De forma semelhante, órgãos de outros países têm regulado os medicamentos liberados para comercialização ou retirados, sendo comum buscarem convergir as suas diretrizes técnicas com os demais países mediante conferências internacionais. No Brasil, atualmente este papel regulatório é realizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) desde a sua criação, em 1999 (ANVISA, 2017).

Os estudos “adequados e bem controlados” basicamente são divididos em testes pré-clínicos e clínicos. O primeiro envolve testes *in vitro* ou em modelos animais de toxicidade, cinética e carcinogenicidade, e tendo sucesso nessa fase, iniciam-se os testes clínicos em humanos (TONKENS, 2005). O cultivo de células em 2D além de fornecer o ambiente para os testes *in vitro* pré-clínicos, também é uma ferramenta muito útil no descobrimento de novos potenciais fármacos. Na busca por fármacos para o tratamento do câncer em suas diversas formas, o cultivo de 2D tradicional de linhagens imortalizadas de tumores forneceu análises farmacológicas significantes nas respostas celulares, fomentando a pesquisa nessa área. No entanto, este não é um modelo representativo do crescimento *in vivo* apresentando pelas células tumorais, pois o câncer cresce em forma de um aglomerado heterogêneo 3D dentro do organismo (CHATZINIKOLAIDOU, 2016).

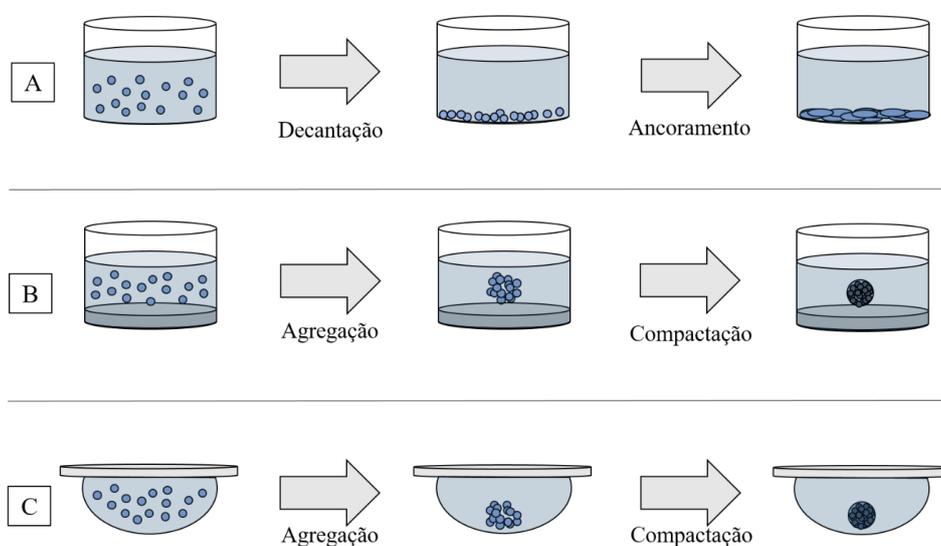
Na busca por modelos mais representativos, o cultivo 3D *in vitro* tem sido usado como um modelo intermediário entre o cultivo 2D tradicional e o tumor *in vivo*, sendo o modelo de câncer esférico um dos mais descritos na literatura, pois consegue mimetizar as limitações da difusão de nutrientes, metabólitos e moléculas afins que ocorrem no tumor *in vivo*, permitindo um maior estudo da fisiopatogenia (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

O cultivo de células cancerígenas em um modelo esferoide de tumor multicelular ainda terá que comprovar a sua validade no que se refere a sua relevância fisiológica. Entretanto, é evidente que o cultivo 3D tem chamado muita atenção no meio acadêmico,

farmacêutico e biotecnológico (SITTAMPALAM et al., 2015). Existem diversos estudos na literatura que já empregam o cultivo em forma de esferoides tumorais multicelulares (MCTS – *multicellular tumor spheroids*), sendo que o primeiro método a ser desenvolvido consistiu em utilizar diferentes formas de impedir a adesão das células a uma superfície, restando a formação de estruturas tridimensionais com outras células para permitir o seu ancoramento.

Com o objetivo de evitar o contato célula-superfície, pode ser utilizado, por exemplo, revestimento com ágar (HO et al., 2012), dimetilsilicone (CHANDRASEKARAN et al., 2012) ou hidrogel hidrofílico (Corning®) (FRANDSEN et al., 2015), além da aplicação da metodologia da gota suspensa (*Hanging Drop*), onde as células devido a força da gravidade, não ficam em contato com nenhuma superfície sólida (AYUSO et al., 2016; RAGHAVAN et al., 2015) (Figura 2). Um exemplo da importância desse estudo foi observada quando o cultivo em esferoide permitiu identificar uma mudança metabólica, que não ocorre no cultivo 2D. Essa mudança foi vista como uma potencial via para o tratamento do câncer, abrindo uma nova área de estudo (KOSHKIN et al., 2016).

Figura 2. Métodos mais comuns de formação de esferoides e diferenças com relação ao cultivo tradicional. (A) cultivo tradicional em duas dimensões. (B) formação de esferoides pelo revestimento de superfícies com película de baixa adesão. (C) formação de esferoides com a metodologia da gota invertida aderida a uma superfície sólida.



Fonte: Adaptado de PATEL et al. (2015); WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE (2015).

Além do modelo esférico simples do MCTS, outros métodos de cultivos de células para o estudo do câncer estão em desenvolvimento. Atualmente, existem quatro grupos de modelos de câncer esféricos principais: MCTS; tumoresferas; esferas originárias de tecido de câncer (CTOS – *cancer tissue-originated spheres*); e esferoides multicelulares organotípicos (OMS – *organotypic multicellular spheroids*). Os MCTS são esferoides formados de uma (homotípico) ou mais (heterotípico) linhagens de células de câncer já diferenciadas. As tumoresferas são formadas por células-tronco tumorais (CSC – *cancer stem cells*), células capazes de se diferenciar para vários tipos de células do seu tecido de origem. Os CTOS são obtidos a partir do cultivo de fragmentos de tumores obtidos por dissociação mecânica ou enzimática do tecido do câncer. Os OMS são modelos de cultivo de fragmentos de tumores *ex vivo* sem realizar dissociação como nos CTOS, apresentando várias similaridades com o tumor *in vivo*, podendo preservar vasos, tecido conectivo e macrófagos (STADLER et al., 2015).

Células de câncer também podem ser aplicadas em experimentos animais para a reconstrução parcial de um tumor, sendo uma forma viável de analisar tumores humanos *in vivo*. Três principais categorias de modelos de câncer *in vivo* pré-clínico são geralmente usados na pesquisa, modelos geneticamente modificados (GEMs – *genetically engineered models*), xenoenxertos derivados de linhagens de células tumorais humanas e fragmentos de tumores humanos obtidos de pacientes, diretamente transplantado em ratos imunodeficientes, sem uma passagem *in vitro* intermediária, denominados de *tumorgrafts* (enxerto de tumor). Todos possuem características moleculares e histopatológicas que permitem que os usem para testar novos compostos, pois apresentam a heterogeneidade característica do câncer humano, porém tal plataforma de teste teria de ser validada por clínicos, biólogos e outros cientistas (DECAUDIN, 2011).

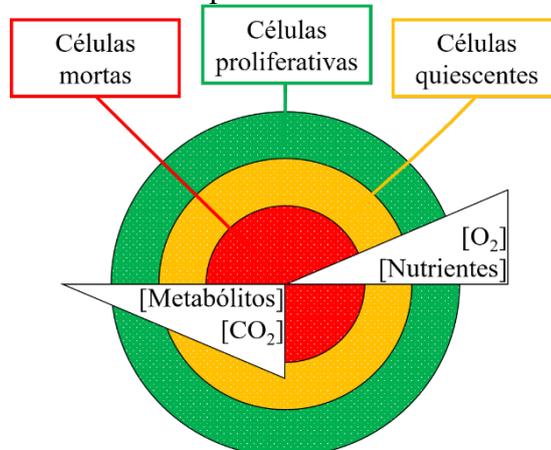
3.3 Biorreatores para cultivos de células

Existem limitações técnicas que fazem com que a implementação de esferoides como modelos celulares do câncer seja insatisfatória na cascata de desenvolvimento de fármacos. Alguns dessas deficiências incluem a falta da reconstrução do microambiente 3D preciso de múltiplos tipos de células devido à falta de controle do número de células e da localização,

além da presença em tamanho variável da zona necrótica, causada pela falta de nutrientes e excesso de metabólitos, um fenômeno natural devido à dificuldade no transporte de moléculas através da densa matriz celular em um esferoide como se mostra na Figura 3 (ZANONI et al., 2016). Essas falhas em mimetizar o microambiente em torno da célula podem ser reconhecidas pela falta de eficácia nas validações de fármacos nos dados de ensaios clínicos de fase II. Para melhorar a eficiência, é necessária a padronização em relação aos tamanhos de esferoides e ao número de células reprodutíveis. Além disso, como é necessário um número elevado de esferoides, as técnicas de cultura de células devem ser adequadas para o aumento de escala e para o fornecimento constante de nutrientes. Ademais, as ferramentas analíticas e de imagem para a aquisição de dados das culturas 3D devem ser melhoradas (CHATZINIKOLAIDOU, 2016).

Visando esse aumento de escala simples e maior controle no fornecimento de nutrientes, biorreatores surgem como uma alternativa aos métodos estudados. Um biorreator é definido como um equipamento capaz de fornecer os requisitos fisiológicos da célula. Isso inclui variáveis físico-químicas, como pH, oxigênio dissolvido ou temperatura, e bioquímicas, como níveis de nutrientes, de metabólitos ou de fatores de crescimento (RODRIGUES et al., 2011).

Figura 3. Modelo representativo comum das diferentes zonas celulares e perfil de concentração de nutrientes e metabólitos presentes em um esferoide multicelular.

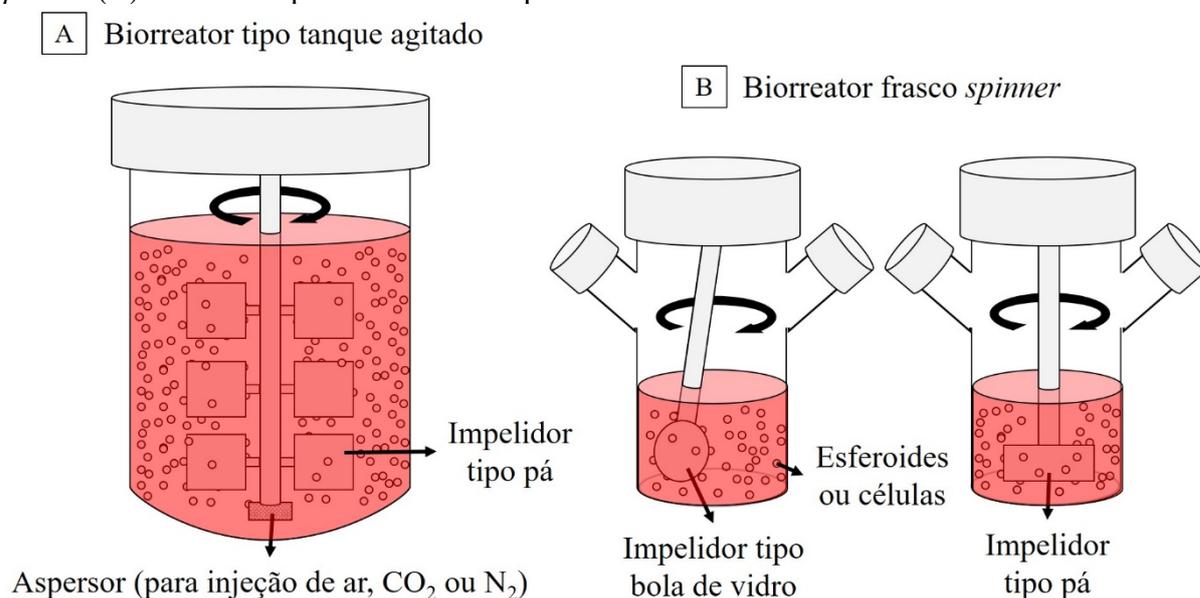


Fonte: Adaptado de ZANONI et al. (2016).

O biorreator mais utilizado ao longo das últimas quatro décadas para cultivo de células animais é o de tanque agitado (STR – *stirred tank bioreactor*) (Figura 4A). Basicamente, o equipamento consiste de um ambiente considerado perfeitamente homogêneo por causa da

agitação provocada por impelidores posicionados no eixo central que gira acionado por um motor elétrico ou um dispositivo magnético. Nos laboratórios de cultivo de células é muito comum o uso de uma versão simplificada de STR de vidro conhecida como frasco *spinner* (Figura 4B) porém, normalmente, não é munido de dispositivos para controle de parâmetros críticos do processo, como pH ou oxigênio dissolvido (OD), e sua capacidade é limitada à alguns litros de volume. O controle de pH do STR ou frasco *spinner* é normalmente realizado pela injeção de CO₂ direta ou indiretamente e pela reação desse gás com o bicarbonato dissolvido no meio de cultivo ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$), enquanto que o controle do OD é feito pela injeção da mistura de oxigênio e nitrogênio (LAWSON et al., 2016).

Figura 4. Diagrama esquemático do biorreator tipo tanque agitado (A) e do biorreator frasco *spinner* (B) com dois tipos comuns de impelidores.



Fonte: Própria.

Frascos *spinner* e tanques agitados com tratamento apropriado na superfície podem gerar esferoides multicelulares em grandes quantidades. O diâmetro médio pode ser controlado por ajustes na densidade do inóculo celular, composição do meio de cultura, velocidade de rotação e tempo de cultivo (LIN; CHANG, 2008). O controle do diâmetro final do agregado é feito pelo balanço entre a força mecânica de atração entre as células e a força cisalhante presente no biorreator que tenta separar esse esferoide, enquanto que a agregação inicial é resultado da quantidade e intensidade das colisões que ocorrem no biorreator, sendo

controlado principalmente pelo inóculo de células e nível de agitação (AYAZI SHAMLOU et al., 1994). A principal limitação identificada neste tipo de biorreator no cultivo de células é a geração de forças cisalhantes máximas muito altas perto dos impelidores, sendo essas classificadas pelo seu efeito nas células. As forças são subletais quando mudam a fisiologia celular e letais quando causam morte celular (MOLLET et al., 2004).

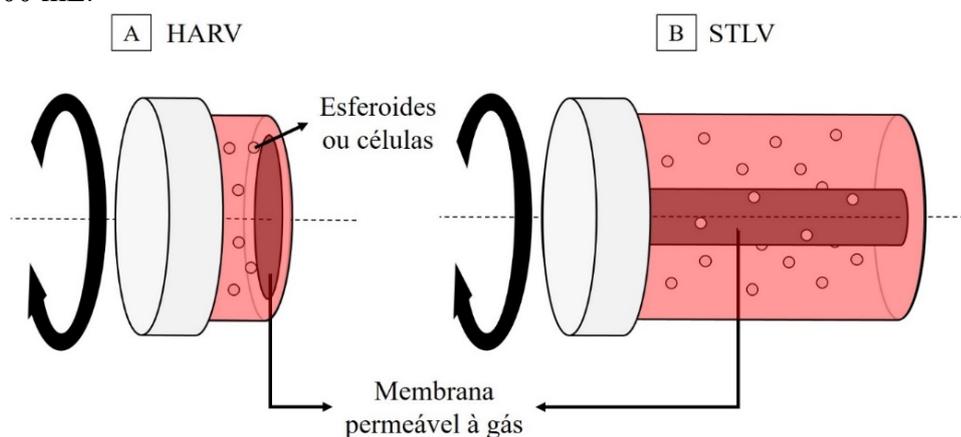
Diversas linhagens e tipos de células foram adaptados para a formação de esferoides e seu cultivo nesses biorreatores, servindo como exemplos: cultivo de hepatócitos em biorreator de tanque agitado operado em perfusão por longos períodos de tempo para testes de doses de fármacos em diferentes períodos (TOSTÕES et al., 2012); cultivo de células-tronco embrionárias em frasco *spinner*, visando melhorar o rendimento da sua expansão através do controle dos esferoides produzidos pela variação da agitação e concentração do inóculo (HUNT et al., 2014); cultivo de células-tronco humanas pluripotentes induzidas em frasco *spinner*, testando variações de nível de viscosidade e velocidade de agitação para controlar a sua produção em massa de esferoides de tamanhos controlados (ABBASALIZADEH et al., 2012).

Uma alternativa ao alto nível de cisalhamento causado pela agitação em biorreatores de tanque agitado ou similares é o cultivo em ambientes com menor intensidade de forças hidrodinâmicas, como por exemplo, cultivar no biorreator de parede rotativa (*Rotating Wall Vessel* – RWV) desenvolvido pela NASA (*National Aeronautics and Space Administration*, Administração Aeronáutica e Espacial Nacional dos Estados Unidos da América) que fornece um ambiente simulado de microgravidade. O biorreator consiste em um reservatório cilíndrico que gira em torno do eixo horizontal para promover a agitação do meio de cultura, neutralizando parte da força gravitacional, evitando assim a sedimentação, permitindo que as células formem os esferoides em suspensão com baixas forças cisalhantes. A versão comercial deste biorreator é comercializado pela empresa Synthecon (EUA), denominado de sistemas de cultivo celular rotativo (*Rotary Cell Culture Systems* – RCCS) como se mostra na Figura 5 (ALESHCHEVA et al., 2016).

Em um trabalho exploratório, 15 linhagens de células de câncer foram cultivadas no HARV, comprovando a sua capacidade de formar esferoides, sendo que o tamanho dos esferoides, a sua forma e compacticidade dependeram da linhagem em uso (INGRAM et al., 1997). Células de carcinoma hepatocelular de fígado humano também formaram esferoides no

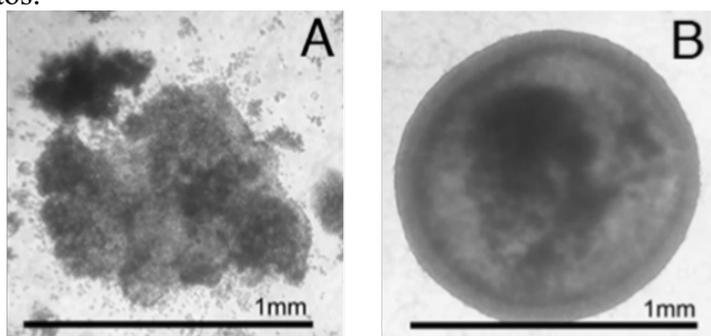
HARV, sendo possível manter esse cultivo por até 10 semanas, apresentando uma morfologia mais esférica somente se continuasse a ser cultivado no biorreator (Figura 6) (CHANG; HUGHES-FULFORD, 2009). Hepatócitos também demonstraram a capacidade de formar esferoides no HARV, apresentando ultraestrutura, morfologia e características funcionais de tecido hepático diferenciado e polarizado (NELSON et al., 2010).

Figura 5. Diagrama esquemático de dois tipos de biorreator RWV. (A) Reservatório de alta razão de aspecto (HARV, *high aspect ratio vessel*), volumes disponíveis de 1 à 50 mL. (B) Reservatório lateral de rotação lenta (STLV, *slow turning lateral vessel*), volumes disponíveis de 55 à 500 mL.



Fonte: Própria.

Figura 6. Análise da influência do ambiente na arquitetura de um esferoide já formado. Esferoides formados após 6 semanas de cultivo em RWV foram transferidos para placas de cultivo planas ou mantidos no biorreator por mais 7 dias. (A) Na placa estática, houve desintegração do esferoide pela mudança de ambiente. (B) No RWV, esferoides permaneceram intactos.



Placa de cultivo estático

RWV

Fonte: CHANG; HUGHES-FULFORD (2009).

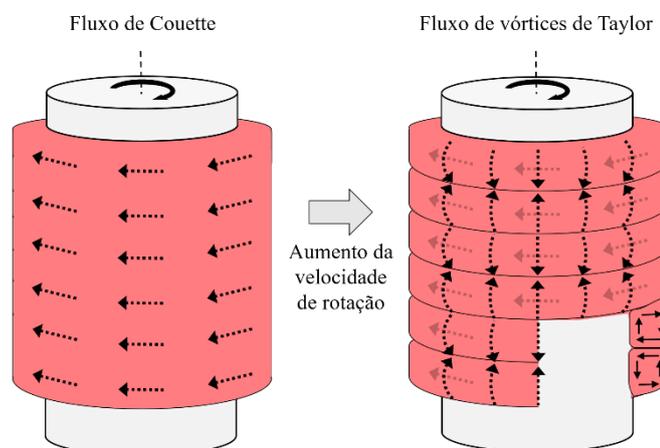
Independentemente dos resultados bastante interessantes obtidos anulando o efeito da gravidade com os dois tipos pequenos de biorreatores RWV descritos, seu uso para produção de esferoides em larga escala não é recomendado porque a configuração horizontal utilizada apresenta muitas dificuldades operacionais ao aumentar de tamanho (AZARIN; PALECEK, 2010; RODRIGUES et al., 2011). Outras opções de aproveitamento das vantagens do princípio de cilindros concêntricos na presença de força de gravidade podem ser exploradas para obter ambientes hidrodinâmicos favoráveis para a produção de agregados de células tumorais.

Apesar do sucesso relatado da formação de esferoides em biorreatores como o frasco *spinner* e o RWV, a distribuição não homogênea do tamanho de esferoides relatada é um outro aspecto negativo do processo, pois torna necessário uma seleção de esferoides subsequente à produção, caso esferoides de mesmo tamanho ou similar se tornar necessários para o processo de descobrimento de novos fármacos em larga escala (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; NATH; DEVI, 2016). No entanto, um aspecto a ser notavelmente valorizado nos biorreatores agitados é a possibilidade de controlar o fornecimento de oxigênio e demais nutrientes por longos períodos de tempo, permitindo assim o cultivo de longo prazo, algo difícil de realizar nos microambientes fornecidos por outras técnicas de cultivo, permitindo o teste de fármacos não somente em dose única, mas com doses repetidas por diferentes períodos (LIN; CHANG, 2008). Modelos esféricos 3D se tornaram imprescindíveis no estudo do câncer, mas se métodos de produção em larga escala adequados não forem desenvolvidos, esses modelos não conseguirão migrar da pesquisa acadêmica para o ambiente farmacêutico industrial, substituindo as técnicas 2D atuais pouco representativas (ALEMANY-RIBES; SEMINO, 2014).

O biorreator RWV normalmente opera a baixas rotações (15-25 rpm), formando um fluxo laminar de Couette no meio de cultivo, nome dado em referência ao primeiro pesquisador a estudar esse tipo de fluxo em um viscosímetro. Esse fluxo se caracteriza pela rotação do fluido seguindo a direção da rotação do cilindro interno gerando um escoamento de líquido bem definido e de baixa tensão de cisalhamento, entretanto, o transporte de massa (oxigênio e nutrientes) pode ser um fator limitante, especialmente em sistemas de grande tamanho (HAUT et al., 2003). Ao aumentar a velocidade de rotação do cilindro interno, forma-se um fluxo laminar de Couette e, a seguir, um fluxo de vórtices de Taylor laminar

(Figura 7), nome referente ao pesquisador que estudou pioneiramente os diferentes fluxos em cilindros concêntricos. Nesse fluxo surgem vórtices toroidais entre os cilindros, cada vórtice tendo velocidade e tamanho iguais. Com o aumento da rotação, o fluxo passa para a possuir ondas periódicas, cuja frequência muda em relação a velocidade angular até um momento onde o fluxo se torna turbulento (CURRAN; BLACK, 2004). Equipamentos capazes de gerar estes diferentes padrões de fluxos são normalmente denominados de biorreatores de vórtice de Taylor (TVB).

Figura 7. Padrões de fluxo formados à medida que se aumenta a rotação do cilindro interno num fluido entre dois cilindros concêntricos.



Fonte: Própria.

O escoamento de líquidos entre dois cilindros concêntricos, quando o interno gira e o externo fica fixo, é um fenômeno de grande interesse na matemática e física. Esse tipo de fluxo vem sendo objeto de pesquisa desde 1923, quando o pesquisador inglês Geoffrey Ingram Taylor estabeleceu as bases teóricas e experimentais para o objetivo de caracterizar a sua hidrodinâmica única, muito dependente da sua geometria, sendo ainda alvo de muitas pesquisas (DHERBÉCOURT et al., 2016; NEMRI; CHARTON; CLIMENT, 2016). Existem relatos também do seu uso como biorreator para o crescimento de diferentes tipos de células, sendo um exemplo, o cultivo de células de estroma da medula óssea de ratos, usando o ambiente de tensão mais homogênea fornecido pelo TVB para aumentar a habilidade das células de depositar cálcio (ZHU et al., 2010). Outro estudo usou o biorreator para cultivar microalgas, motivado pela possibilidade de controlar a exposição de luz temporal através do fluxo dos vórtices de Taylor, fator considerado crucial para permitir o aumento na produção

de biomassa relatado (KONG; SHANKS; VIGIL, 2013). O TVB também foi utilizado para o cultivo da linhagem industrial de células do ovário de hamster chinês (CHO – *Chinese Hamster Ovary*), tendo como objetivo estudar o efeito do ambiente de tensão cisalhante mais homogêneo sobre essa linhagem já adaptada para STR de alto volume (SORG et al., 2011). A conclusão desse estudo foi que a estreita distribuição de estresses hidrodinâmicos torna o TVB em uma interessante alternativa ao tanque agitado, quando o objetivo for cultivar células sensíveis ao cisalhamento, pois este biorreator pode operar com uma taxa de dissipação de energia maior do que o STR em ordem de magnitude, enquanto fornece tensões locais menores do que as máximas encontradas no STR, localizadas perto do impelidor.

3.4 Comentários finais sobre a revisão bibliográfica

Como observações mais relevantes desta revisão bibliográfica podem-se destacar os seguintes aspectos:

a) O uso do cultivo de células para avaliação da eficácia e toxicidade de fármacos através do cultivo em 3D em forma de esferoides é uma necessidade tecnológica bem definida que oferece novas oportunidades de pesquisa e desenvolvimento.

b) O caso do câncer de bexiga como objeto de estudo mostra-se interessante e apropriado por representar um problema de saúde relevante no Brasil e no mundo. Além disso, o fato da RT4 ser de um câncer não invasivo facilita os estudos iniciais sobre o processo específico de agregação de células, uma vez que a migração celular como um fenômeno paralelo ao de agregação deve introduzir variáveis complexas pouco estudadas do ponto de vista biológico, físico e matemático.

c) A literatura sobre o uso de biorreatores “sob medida” para produção eficiente de esferoides de células tumorais é escassa. A utilização de biorreatores do tipo RWV, apesar dos bons resultados em tamanhos pequenos (mostrados 50 mL à 500 mL), não são recomendados para uso em escalas como as que demandam as avaliações de fármacos.

d) A versão alternativa de um RWV proposta neste trabalho (o TVB) oferece características com grande potencial para preencher a limitação dos RWV mencionada no item anterior.

e) Na avaliação de um TVB para produção eficiente de esferoides de células tumorais é importante levar em consideração as variáveis mais relevantes do processo de agregação: agitação e concentração e inóculo.

Sendo assim, o TVB, biorreator foco do estudo desta tese, entra neste cenário como uma alternativa interessante ainda não explorada na área de produção de esferoides, que deve ser investigada, pois pode permitir a produção de esferoides em grandes quantidades e com alta produtividade, podendo atingir a uniformidade de tamanho desejada, sem sujeitar as células à tensões de cisalhamento subletais e letais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem de células e meio de cultura

A linhagem da RT4 foi fornecida pela Prof.^a Dr.^a Kamilla Swiech Antonietto (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, FCFRP – USP) com autorização da Prof.^a Dr.^a Priscyla Daniely Marcato Gaspari (FCFRP – USP), sendo essa linhagem proveniente de um banco de células (BCRJ 0214) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). No cultivo dessa célula foi utilizado meio de cultura McCoy 5A com HEPES 5,96 g/L, bicarbonato de sódio 2,2 g/L (Sigma-Aldrich, EUA) e 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (HyClone[®], Thermo Scientific, EUA). Para dissolução do meio foi utilizada água ultrapura do tipo 1 (Milli-Q[™]) obtida pelo sistema Simplicity (Millipore Corporation, EUA). Após a adição dos componentes o meio foi esterilizado por filtração através de membranas de 0,22 µm.

4.2 Formação do banco de células e experimento 2D

A linhagem RT4 foi ativada e cultivada em frascos T de cultivo celular (TPP, SWE) com o inóculo inicial de 2×10^4 células/cm², sendo a transferência para uma nova garrafa realizada antes da confluência total das células, enquanto estas estivessem em crescimento. Adicionalmente eram realizadas a troca de metade do meio de cultura por um meio novo a cada 3 dias para repor nutrientes e retirar metabólitos indesejáveis. O banco de células foi formado com o total de 20 criotubos, cada um contendo 3×10^6 células em meio de cultura com 5% (v/v) do crioprotetor DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) armazenados em um recipiente de armazenamento com nitrogênio líquido a -196 °C. Todos os experimentos de um mesmo grupo foram realizados com células com o mesmo número de passagens e tempo de cultivo para evitar qualquer variabilidade no inóculo dos experimentos de cultivo em TVB.

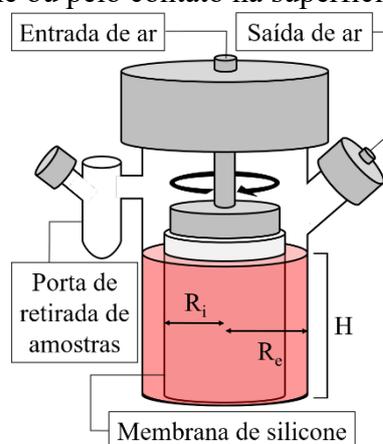
Com o objetivo de analisar as características dessa linhagem em cultivo estático 2D, foi realizado um cultivo em placa de poços em duplicata com tempo de cultivo de 168 horas e inóculo de 2×10^4 células/cm² (1×10^5 células/mL) sem realizar troca de meio de cultura.

Realizou-se também um cultivo controle sem células em conjunto para avaliar as alterações nas concentrações dos componentes do meio, sem o consumo ou produção proveniente das células. A amostragem era realizada a cada 24 horas, analisando número de células, concentração de glicose, lactato e aminoácidos.

4.3 Biorreator de vórtice de Taylor

O TVB utilizado neste trabalho foi construído no laboratório de tecnologia de cultivos celulares LATECC do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) utilizando como base o protótipo sendo desenvolvido na tese de Liseth Viviana Gonzalez Gil do Programa e Pós-graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da UFSCar. Por razões de economia e de simplificação do trabalho experimental, os experimentos de cultivo visando a avaliação do desempenho do TVB foram realizados num protótipo de 100 mL com as seguintes características: raio do cilindro externo (R_e) de 0,0305 m; raio de cilindro interno (R_i) de 0,023 m; e altura de líquido (H) de 0,077 m (Figura 8).

Figura 8. Esquema do TVB utilizado. Portas de entrada e saída de ar possuem filtros de ar de 0,22 μm permitindo uma aeração livres de bolhas pelo ar só entrar em contato com o meio através da membrana de silicone ou pelo contato na superfície do líquido.

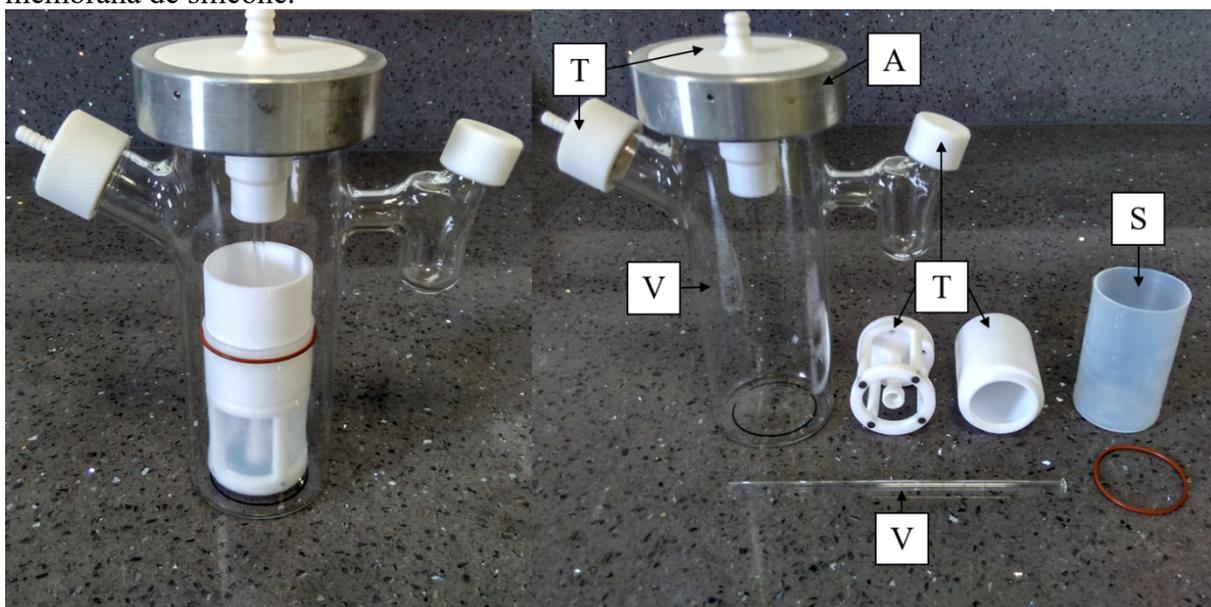


Fonte: Própria.

O biorreator foi construído utilizando materiais inertes e resistentes à temperatura de esterilização em autoclave (121 °C). As peças de vidro (cilindro externo e tubo central que conecta o cilindro interno com a tampa), politetrafluoretileno (PTFE) (tampas e estrutura que

suporta a membrana) e aço (revestimento da tampa principal) do biorreator foram construídas nas oficinas da UFSCar. A membrana de silicone permeável a oxigênio confeccionada com o selante adesivo de borracha de silicone RVT 118 (Momentive, EUA) foi moldada no LATECC com o equipamento adequado construído na oficina da UFSCar, ela foi fixada à estrutura de teflon pelo uso de uma anel de borracha na sua parte superior. A estrutura central interna de teflon possuía quatro discos magnéticos em sua base para permitir a rotação do cilindro interna pela ação externa de um agitador magnético. Como se pode perceber o biorreator está munido de instrumentação apropriada para monitoramento dos cultivos sem perturbar as condições hidrodinâmicas. O TVB montado e suas peças podem ser vistos na Figura 9. A tampa principal e lateral possuem estruturas projetadas para anexar tubos e filtros de ar, o que foi realizado, porém não foi realizada alimentação direta de ar durante os experimentos.

Figura 9. Fotos do TVB confeccionado no LATECC. (T) indica as peças confeccionadas com politetrafluoretileno (comercialmente conhecido como teflon). (A) indica o revestimento de aço para a tampa. (V) indica o recipiente e tubo confeccionados com vidro. (S) indica a membrana de silicone.

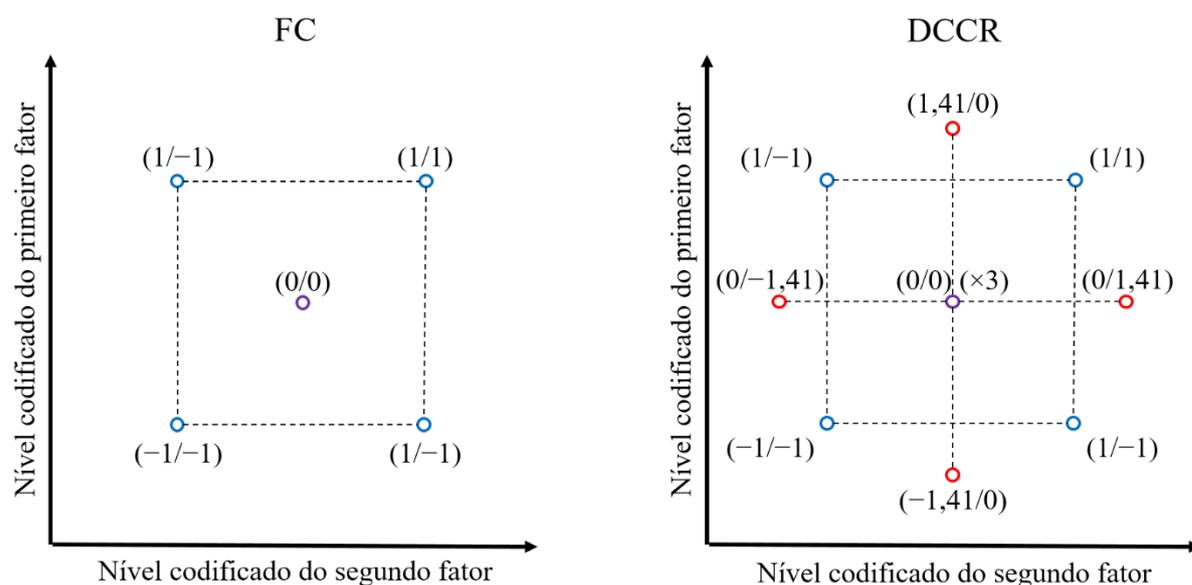


Fonte: Própria.

4.4 Metodologia de experimento de cultivo no TVB

Visando obter uma quantidade de informação significativa sobre a influência das variáveis a serem testadas e verificar se estas têm interação entre si, foi utilizado um planejamento experimental apropriado para análise estatística. Tendo duas variáveis, agitação e concentração de inoculo, a escolha foi de realizar um planejamento fatorial completo (FC) de dois fatores (2^2) que consiste na análise de dois níveis de cada fator, adicionalmente foi realizado um experimento no ponto médio entre os níveis analisados, totalizando em 5 experimentos. Esse planejamento permitiu um estudo inicial do efeito dos dois fatores nas variáveis resposta, permitindo analisar se eles realmente tiveram influência significativa. Após essa análise, a próxima etapa foi realizar um delineamento central composto rotacional (DCCR), que consiste na análise de cinco níveis de cada fator de forma a totalizar 9 experimentos (2^3+3), além de 3 replicatas do ponto central. A escolha por um DCCR foi baseada na capacidade de gerar uma superfície de resposta 3D confiável, permitindo que se aprimore o processo de produção de esferoides. A Figura 10 mostra a forma de construção de um FD e DCCR com dois fatores. Os níveis dos fatores são codificados para facilitar os cálculos.

Figura 10. Esquema da construção de um planejamento fatorial do tipo FC e DCCR indicando os níveis dos fatores (variáveis independentes).



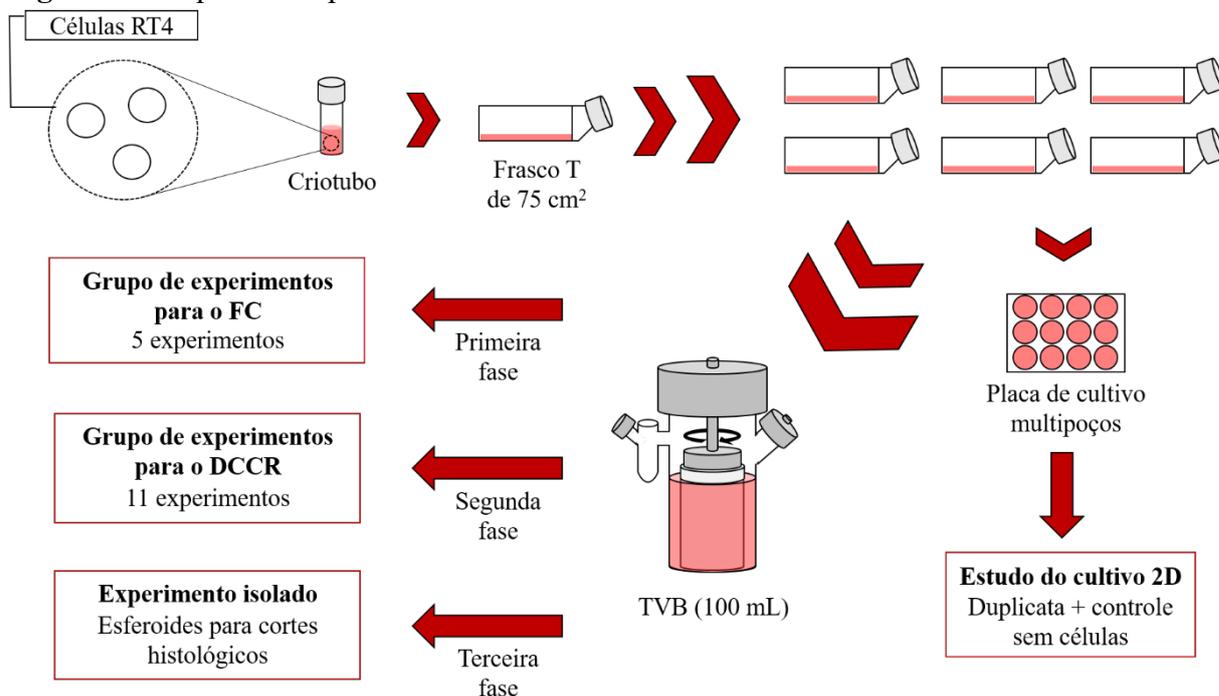
Os experimentos no FC duraram 72 horas cada, sendo os biorreatores mantidos em incubadora a 37 °C, com suprimento de níveis controlados de CO₂ para agir no sistema tampão do bicarbonato de sódio presente no meio de cultivo, com a finalidade de manter níveis adequados de pH. As primeiras 6 horas de cultivo foram realizados com agitação por somente 5 min a cada 2 horas, o objetivo desse período era facilitar a agregação inicial, baseado em relatos na literatura (HUNT et al., 2014) e experimentos iniciais, após esse tempo, a agitação era mantida sem interrupções além daquelas realizadas brevemente para o processo de amostragem. Os níveis usados das variáveis independentes (vide Tabela 1) nesses experimentos preliminares foram baseados em testes realizados em nosso laboratório, além de relatos da literatura (HUNT et al., 2014; SANTO et al., 2016). Com base nos resultados obtidos por este grupo preliminar foi montado o DCCR (vide Tabela 2) com cada experimento durando 168 horas, com o objetivo de analisar não somente a formação, mas também a manutenção dos esferoides em ambiente agitado. Neste grupo principal de experimentos, não foi realizada a etapa inicial com agitação a cada 2 horas, ou seja, a agitação era iniciada no tempo zero e não era mais interrompida, somente uma vez ao dia para retirada de amostra. Adicionalmente, foi realizado um cultivo com agitação em 100 rpm e inóculo de 2×10^5 células/mL com amostragem somente no último ponto para análise dos esferoides e teste da superfície de resposta gerada no DCCR. A Figura 11 resume o trabalho experimental realizado neste trabalho.

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes testados no planejamento FC.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Agitação (rpm)	85	97,5	110
Inóculo ($\times 10^5$ células/mL)	2,4	3,5	4,6

Tabela 2. Níveis das variáveis independentes testados no planejamento DCCR.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Agitação (rpm)	60	69	90	111	120
Inóculo ($\times 10^5$ células/mL)	1	2,3	5,5	8,7	10

Figura 11. Esquema simplificado dos cultivos realizados neste estudo.

A amostragem no FC foi realizada a cada 12 horas, no DCCR a cada 24 horas, retirando do biorreator aproximadamente 5 mL, sendo o volume de meio restituído para não alterar o volume de trabalho de 100 mL. Com o sobrenadante da amostra eram realizadas análises de pH, concentração de glicose e lactato. No DCCR, com as amostras de tempo 0, 48, 120 e 168 horas foi realizada a análise da concentração de aminoácidos. Com os esféroides presentes na amostra, foram realizadas as análises das características geométricas e quantificação.

4.5 Metodologias analíticas

4.5.1 Análise de pH e densidade celular

As análises de pH foram realizadas com pHmetro (Mettler Toledo, EUA) logo em seguida do processo de amostragem no biorreator para evitar a variação na medida. A amostra era então centrifugada a 1000 g por 5 minutos para a retirada do sobrenadante, usado em processos de análise de nutrientes, sendo que os esféroides restantes da amostra eram

coletados para análises posteriores. Nas passagens dos frascos T e experimento em placa de poços, a densidade celular foi obtida por contagem de células viáveis pelo método de exclusão com azul de Trypan (solução 0,4%, Sigma-Aldrich, EUA) que cora células não viáveis. A quantificação das células eram realizadas em duplicata na câmara de Neubauer (Kasvi, BRA). Nos experimentos do grupo de DCCR, os esferoides em cada amostra obtida foram dissociados com enzima tripsina 0,05%/ EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich, EUA) por 10 minutos, sendo a concentração de células viáveis quantificada pelo método com azul de Trypan.

4.5.2 Análise da concentração de glicose, lactato e aminoácidos

A análise da concentração de glicose e lactato foi realizado com bioanalisador enzimático 7100 MBS (*Multiparameter Bioanalytical System*) (YSI, EUA). Sua metodologia baseia-se na produção de peróxido de hidrogênio pela enzima oxidase imobilizada em membranas na presença do substrato. O peróxido é então oxidado em um ânodo de platina produzindo elétrons em uma taxa constante e proporcional à quantidade de substrato, sendo assim definida a concentração do substrato.

Aminoácidos foram quantificados pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras do sobrenadante eram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos e filtrados com filtro 100K (Amicon Ultra, Millipore, EUA). A análise foi realizada seguindo uma versão modificada de uma metodologia relatada na literatura (HEINRIKSON; MEREDITH, 1984). O método usado analisou 19 aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina e valina). A separação cromatográfica por fase reversa foi obtida usando uma coluna de análise Pico-tag® (Waters, EUA) a 36 °C.

4.5.3 Análise dos esferoides

Ao final de cada experimento no planejamento FC ou a cada dia no DCCR, foram retiradas três alíquotas de 0,2 mL de esferoides em suspensão, sendo quantificados visualmente em microscópio. Fotos dos esferoides restantes na amostra ou em todo o volume

do TVB (caso fosse o último ponto de amostragem) foram usadas para análise no software ImageJ 1.5 (Instituto Nacional da Saúde, EUA), sendo o valor da área do esferoide e demais parâmetros quantificados neste programa pela conversão de pixels para milímetros. Com o valor da área em mm², o diâmetro médio (DM) foi obtido pela seguinte equação:

$$DM = \sqrt{\frac{4 \times \text{Área}}{\pi}} \quad (4.1)$$

Com os valores obtidos de DM, a sua média aritmética (\bar{DM}) e desvio padrão (σ_{DM}), o coeficiente de variação (CV, %) foi calculado pela seguinte equação;

$$CV = \frac{\sigma_{DM}}{\bar{DM}} \times 100 \quad (4.2)$$

A circularidade (C_i , %) foi obtida pela seguinte equação:

$$C_i = 4\pi \frac{\text{Área}}{\text{perímetro}^2} \times 100 \quad (4.3)$$

4.5.4 Análise de morfologia por cortes histológicos

No experimento adicional a 100 rpm e com 2×10^5 células/mL, os esferoides foram retirados do biorreator e fixados com formalina neutra tamponada (10% v/v formaldeído, 4 g/L NaH₂PO₄ e 6,5 g/L Na₂HPO₄ em água destilada, pH 6,8) por um dia, sendo então parafinizados. Em seguida, foram realizados cortes de 10 µm no bloco, montando lâminas com os cortes corados com hematoxilina-eosina, hematoxilina para corar com tons azuis substâncias ácidas como o núcleo e ácidos nucleicos, enquanto que a eosina é usada para corar com tons vermelhos substâncias básicas como o colágeno (CRISTINA et al., 2013). A análise destes cortes corados foi realizado no Pannomarc DESK (3D Histech, HUN) com o intuito de analisar a morfologia das células dentro dos esferoides.

4.6 Cálculos de variáveis e parâmetros bioquímicos

Os cálculos realizados das equações demonstradas a seguir e disposição dos dados obtidos em gráficos foram realizados através do software OriginPro 2016 (OriginLab Corporation, EUA).

A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{N_x} \frac{dN_x}{dt} \quad (4.4)$$

onde:

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

N_x = número de células viáveis (células)

t = tempo (h)

O consumo específico de nutrientes (q_{nut}) foi calculado pela seguinte equação:

$$q_{nut} = \frac{1}{N_x} \frac{dn_{nut}}{dt} \quad (4.5)$$

onde:

q_{nut} = consumo específico de nutriente (mmol/células·h)

n_{nut} = número de mols de nutriente (mmol)

O rendimento de células geradas pela quantidade de glicose consumida foi calculada pela seguinte equação:

$$Y_{x/gli} = \frac{dN_x/dt}{dn_{gli}/dt} \quad (4.6)$$

onde:

$Y_{x/gli}$ = Rendimento celular do consumo de glicose (células/mmol)

Para a análise do processo de agregação e formação de esferoides, foi utilizado um modelo de crescimento logístico do diâmetro médio, apresentando um encaixe adequado em todos os experimentos realizados ($R^2 > 0,96$). O modelo possibilitou a simulação do diâmetro médio nos experimentos onde a amostragem era dificultada pela baixa quantidade de esferoides produzidos (<1000). Os dados deste cálculo serão apresentados nos gráficos dos experimentos do DCCR como CLS (crescimento logístico simulado). A equação aplicada foi definida como:

$$DM = \frac{DM_F}{1 + e^{-k(t-t_c)}} \quad (4.7)$$

onde:

DM = diâmetro médio no tempo t (mm)

DM_F = diâmetro final (mm)

t_c = valor de t no ponto médio da curva sigmoide (h)

k = constante de declividade da curva (h^{-1})

4.7 Cálculo da tensão de cisalhamento máxima

A tensão máxima de cisalhamento que estava presente no fluido em suspensão foi determinado para todos os níveis testados aplicando fórmulas encontradas na literatura para sistemas similares (LATHROP; FINEBERG; SWINNEY, 1992; LIM; TAN, 2004; RACINA; KIND, 2006). A tensão de cisalhamento máxima calculada como:

$$\tau_{max} = \gamma \mu_v \quad (4.8)$$

onde:

τ_{max} = tensão máxima de cisalhamento (Pa)

γ = taxa de cisalhamento (s^{-1})

μ_v = viscosidade do fluido ($kg/m \cdot s$)

A viscosidade do fluido, meio de cultura com 10% de soro fetal bovino a 37 °C, foi definido como 0,001 $kg/m \cdot s$ (LAKHOTIA; PAPOUTSAKIS, 1992). A taxa de cisalhamento foi calculada como:

$$\gamma = \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.9)$$

onde:

ε = dissipação de energia (W/kg)

ν = viscosidade cinemática do fluido (m^2/s)

A viscosidade cinemática do fluido foi definida como $9,97 \times 10^{-7} m^2/s$ (CROUGHAN; SAYRE; WANG, 1989; LAKHOTIA; PAPOUTSAKIS, 1992). A dissipação de energia foi calculada como:

$$\varepsilon = \frac{T \Omega}{\rho V} \quad (4.10)$$

onde:

T = torque ($N \cdot m$)

Ω = velocidade de rotação do cilindro interno (rad/s)

ρ = densidade do fluido (kg/m^3)

V = volume do fluido entre os cilindros (m^3)

A densidade do fluido foi definida como 1004 kg/m^3 (CROUGHAN; SAYRE; WANG, 1989). O volume de fluido entre os cilindros era de $9,2 \times 10^{-5} \text{ m}^3$. O torque era calculado como:

$$T = G \rho v^2 H \quad (4.11)$$

onde:

G = torque adimensional

H = altura do fluido (m)

A altura do fluido era de 0,077 m. O valor de torque adimensional, para número de Reynolds entre 400 e 10000, é definido como:

$$G = 1,45 \frac{\eta^{3/2}}{(1-\eta)^{7/4}} Re^{3/2} \quad (4.12)$$

onde:

η = razão entre cilindro interno e cilindro externo do TVB

Re = número de Reynolds

A razão entre cilindro interno e externo era de 0,75. O número de Reynolds para o TVB foi calculado como:

$$Re = \frac{\Omega R_i d}{v} \quad (4.13)$$

onde:

R_i = raio do cilindro interno (m)

d = distância entre os cilindros interno e externo (m)

A distância entre os cilindros interno e externo era de 0,0075 m.

4.8 Cálculos estatísticos

Todos os dados aprestados estão na forma de média aritmética dos pontos obtidos, seguidos do desvio padrão de 3 valores (quantificação de esferoides), de 4 valores (análise de densidade celular e concentração de glicose, lactato e aminoácidos) ou do número variável de esferoides disponíveis, analisando no máximo 200 esferoides mesmo se um número maior estivesse na amostra.

Modelos matemáticos descrevendo a relação entre as variáveis resposta e variáveis independentes foi desenvolvido identificando os coeficientes de uma equação de primeira ordem (no FC) e de segunda ordem (no DCCR). O coeficiente de regressão R^2 definiu a precisão do modelo e a significância deste foi determinado com um intervalo de confiança de 95%. Para identificar os termos com significância estatística da equação, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada. O software STATISTICA (StatSoft, EUA) foi utilizado para estes cálculos.

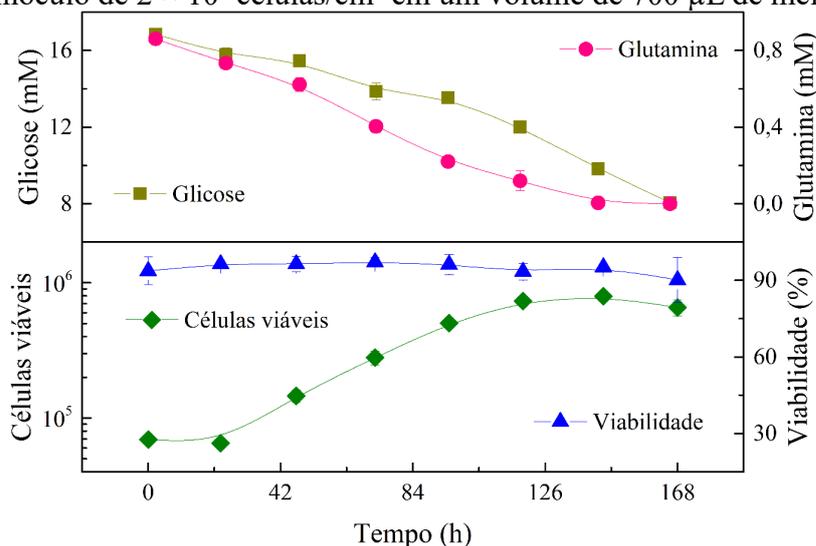
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sendo o TVB, um equipamento novo, sem dados na literatura quanto ao cultivo de células de câncer, visando à formação de esferoides ou não, se fez necessário um estudo prévio do metabolismo da célula em um cultivo estático, que foi utilizado como ponto de referência para a comparação com os resultados obtidos no biorreator. Em seguida, são apresentados e discutidos resultados dos experimentos realizados nesta pesquisa. No final deste capítulo, são feitas comparações com outras plataformas de produção de esferoides.

5.1 Experimento preliminar 2D

O crescimento em cultivo estático é a forma tradicional de cultivar células RT4, sendo esta a forma na qual foi cultivada desde o seu estabelecimento como linhagem de células obtidas de um tumor. Mesmo que a célula se comporte diferentemente em cultivos 3D a análise de seu comportamento em um cultivo 2D pode proporcionar dados de referência ao presente estudo extremamente úteis na análise dos resultados dos cultivos 3D no TVB na forma de esferoides. Os dados obtidos no cultivo em placa de poços podem ser vistos na Figura 12.

Figura 12. Resultados obtidos do cultivo em placa de 12 poços com células RT4 realizado em duplicata com inóculo de 2×10^4 células/cm² em um volume de 700 μ L de meio McCoy 5A.



O número máximo de células obtido foi de $7,95 \times 10^5$ células, representando um fator de expansão de 11,5 vezes em 144 horas. Em sua fase de crescimento exponencial (de 24 até 96 horas) foi obtido um valor de velocidade específica de crescimento (μ) de $0,025 \pm 0,001$ (tempo de duplicação de 27,7 horas). O número de células com 168 horas de cultivo resultou num tempo de duplicação de 51,3 horas, que se assemelha ao tempo de 40-64 horas relatado para essa linhagem (VALLO et al., 2015). Os dados obtidos do consumo das principais fontes de energia (glicose e glutamina) se encontram na Tabela 3. Os níveis obtidos de consumo destas fontes na fase de crescimento exponencial servem de exemplo de valores encontrados quando as células estão com o seu metabolismo focado para proliferação celular, enquanto que nas fases de desaceleração e estacionária (de 120 até 168 horas), as células possivelmente estejam progressivamente entrando em estado de apoptose. Vale ressaltar que a glutamina se esgotou no meio de cultivo em 144 horas de cultivo. Como os experimentos de formação de esferoides em biorreator não foram planejados para durar tanto tempo inicialmente, não foi julgado necessário suplementar o meio com glutamina. Nenhum outro aminoácido apresentou consumo ou produção significativa (maior que 50%). O valor do rendimento celular do consumo de glicose ($Y_{x/gli}$) na fase de crescimento (24 até 72 horas) foi de $1,34 \pm 0,10 \times 10^8$ células/mmol.

Tabela 3. Consumo das principais fontes de energia no cultivo estático.

	Fase A De 24 até 72 horas	Fase B De 96 até 144 horas
Consumo de glicose ($\times 10^{-6}$ mmol/h)	31,87 \pm 0,13	48,88 \pm 0,84
Consumo de glutamina ($\times 10^{-6}$ mmol/h)	3,73 \pm 0,21	3,62 \pm 0,15
Consumo específico de glicose ($\times 10^{-11}$ mmol/célula·hora)	25,92 \pm 2,52	7,26 \pm 0,18
Consumo específico de glutamina ($\times 10^{-11}$ mmol/célula·hora)	3,16 \pm 0,46	0,58 \pm 0,02

5.2 Grupo inicial de experimentos para formação de esferoides no TVB e cálculos de parâmetros do biorreator

5.2.1 Valores da tensão de cisalhamento

O presente estudo foi completado usando um protótipo específico de biorreator, então para que os resultados sejam mais aplicáveis a outros sistemas, parâmetros de engenharia como a tensão de cisalhamento máxima e o número de Reynolds devem ser determinados. Usando os métodos citados, os valores encontrados para todos os níveis de agitação usados neste estudo podem ser vistos na Tabela 4. Os maiores valores obtidos estão 400 vezes menores que os níveis de tensão já utilizados em estudos de formação de esferoides de células embrionárias (HUNT et al., 2014) e 9000 vezes menores que os já relatados por causarem danos letais às células animais (MOLLET et al., 2008). Os valores calculados indicam que o movimento do fluido dentro do TVB está classificado entre o fluxo de vórtice ondulado (WVF – *Wavy Vortex Flow*) (número de Reynolds entre 400 e 1800) e o fluxo de vórtice ondulado modulado (MWVF – *Modulated Wavy Vortex Flow*) (número de Reynolds menor que 4000). O WVF é o fluxo de Taylor comum (Figura 7) com a presença de um comprimento de onda axial relativa ao tamanho do vórtice, com o aumento do número Reynolds, esse fluxo se torna modulado por mais frequências até eventualmente se tornar um vórtice turbulento (NEMRI; CHARTON; CLIMENT, 2016).

Tabela 4. Valores calculados para o número de Reynolds e tensão de cisalhamento máxima para cada nível de agitação usado (cálculo baseado nas fórmulas apresentadas no 4.7)

Velocidade de agitação (rpm)	Número de Reynolds	Tensão de cisalhamento máxima (Pa)
60	1088	0,044
69	1251	0,053
85	1542	0,069
90	1632	0,074
97,5	1768	0,081
110	1814	0,084
111	1995	0,095
120	2013	0,096

5.2.2 Grupo de experimentos para o FC

Seguindo a tabela apresentada no item 4.4, os experimentos iniciais de formação de esferoides realizados foram os de inóculo variando de $2,44 \times 10^5$ até $4,56 \times 10^5$ células/mL e de agitação partindo de 85 até 110 rpm.

Na Figura 13, pode-se observar o gráfico do histórico de pH dos cinco experimentos. Pode ser visto nesta figura que o pH na maioria dos experimentos ficou em níveis suportáveis pelas células (entre 7,4 e 7,0) de acordo com a ATCC® (*American Type Culture Collection*). Alguns dos esferoides formados em cada experimento podem ser visualizados na Figura 14.

Figura 13. Resultados do nível de pH dos cinco experimentos do grupo inicial. Agitação variou de 85 rpm até 110 rpm e o inóculo inicial de $2,44 \times 10^5$ até $4,56 \times 10^5$ células/mL. O volume de meio McCoy 5A utilizado foi de 100 mL.

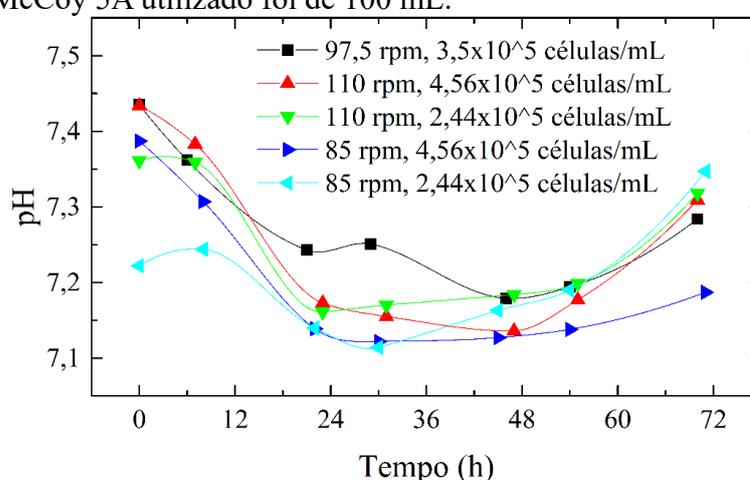
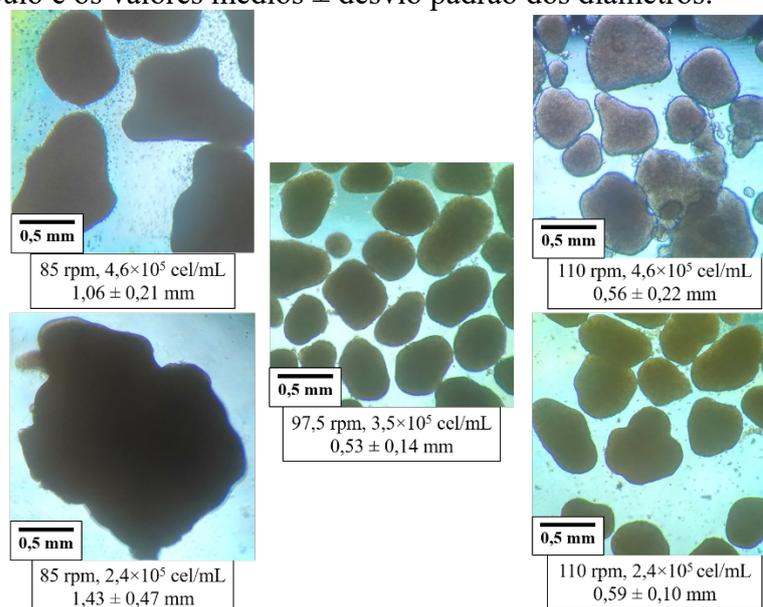


Figura 14. Fotos dos esferoides formados para cada um dos experimentos do FC, seus níveis de agitação, inóculo e os valores médios \pm desvio padrão dos diâmetros.



Experimento a 97,5 rpm com $3,5 \times 10^5$ células/mL: este foi o experimento com maior número de esferoides gerados, sendo gerados aproximadamente 29 esferoides por mL com 72 horas de cultivo. O alto número de esferoides facilitou a amostragem.

Experimento a 110 rpm com $4,56 \times 10^5$ células/mL e $2,44 \times 10^5$ células/mL: no B, foi gerado um número menor de esferoides, aproximadamente 5 esferoides por mL, o que causou dificuldade no processo de amostragem. No C foi gerado uma maior quantidade de esferoides, aproximadamente 13 esferoides por mL, mesmo assim ainda existiu a dificuldade em obter amostras homogêneas representativas durante o experimento.

Experimento a 85 rpm com $4,56 \times 10^5$ células/mL e $2,44 \times 10^5$ células/mL: no D, o número de esferoides gerados foi baixo, aproximadamente 2 esferoides por mL. Com o E, foi obtido o menor número de esferoides gerados nesta série de experimentos, que foi de aproximadamente 0,3 esferoides por mL. Este baixo número de esferoides torna pouco provável que uma amostra para contagem seja representativa do total encontrado no biorreator durante o experimento. O tamanho atingido por estes esferoides provocou a sua decantação, forçando os esferoides a permanecer na parte inferior do biorreator, mesmo que ainda que estes estejam se movimentando. O mesmo não foi observado nos outros experimentos.

Com os resultados obtidos, se tornou possível realizar uma análise dos efeitos de cada variável e assim planejar os próximos experimentos. Na Tabela 5 pode-se ver os resultados obtidos e na Tabela 6 pode-se ver os valores dos coeficientes calculados que permitem uma previsão dos efeitos da variação da agitação e concentração de inóculo em 72 horas de cultivo de células RT4 no TVB. Os níveis de circularidade estão ainda abaixo do relatado como ótimo (>90%) (ZANONI et al., 2016).

Tabela 5. Resultados obtidos do primeiro grupo de experimentos no TVB, todos os dados foram obtidos nas amostras finais de cada experimento com duração de 72 horas.

Agitação (rpm)	Inóculo ($\times 10^5$ células/mL)	Número de esferoides	Diâmetro médio (mm)	CV (%)	Circularidade (%)
85	2,44	30	$1,43 \pm 0,47$	32,6	$81,3 \pm 9,8$
110	2,44	1333 ± 544	$0,59 \pm 0,10$	17,4	$88,0 \pm 3,6$
85	4,56	207	$1,06 \pm 0,21$	19,4	$86,9 \pm 6,6$
110	4,56	500 ± 333	$0,56 \pm 0,22$	39,7	$89,0 \pm 3,2$
97,5	3,5	2889 ± 192	$0,53 \pm 0,14$	26,0	$88,8 \pm 3,4$

Tabela 6. Valores dos coeficientes lineares de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do FC. Os valores estão apresentados com seu valor-p calculado. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. Coef = coeficiente.

	Número de esferoides		Diâmetro médio		CV		Circularidade	
	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p
	$R^2 = 0,182$		$R^2 = 0,821$		$R^2 = 0,996$		$R^2 = 0,879$	
IT	992	0,485	0,83	0,114	0,27	0,012*	0,87	0,007*
A	399	0,771	-0,34	0,295	0,01	0,272	0,02	0,299
I	-164	0,902	-0,10	0,657	0,02	0,157	0,02	0,373
AI	-252	0,851	0,09	0,670	0,09	0,041*	-0,01	0,482

* $p < 0,05$

A fórmula que calcula o efeito previsto das variáveis dependentes é

$$VP = IT + A N_A + I N_I + AI N_A N_I \quad (5.1)$$

onde:

VP = Valor Previsto

N_A = Nível de agitação codificado

N_I = Nível de inóculo codificado

Com base na análise dos coeficientes podemos verificar que com os resultados obtidos, o aumento da agitação tende a aumentar o número de esferoides gerados, diminuir o tamanho médio, afetando pouco a variabilidade do tamanho e circularidade. O aumento do inóculo diminui a quantidade de esferoides formados, diminui o tamanho dos esferoides formados, afetando pouco a variabilidade e circularidade. O efeito da interação entre as duas variáveis é mais visível no aumento da variabilidade entre os tamanhos dos esferoides produzidos e na diminuição da quantidade de esferoides.

Tendo em vista que o principal objetivo da nova metodologia de cultivo que está sendo desenvolvida nesse trabalho é a formação de esferoides com alta produtividade, podemos dizer que os melhores resultados previstos para outros experimentos estão próximo da região com agitação de 110 rpm e inóculo de $2,44 \times 10^5$ células/mL. Apesar dos resultados terem alcançado o objetivo inicial do estudo, os efeitos dos fatores testados ainda foram considerados baixos e não tiveram significância estatística. Portanto, além de mudar a fase inicial de cada experimento de agitação intermitente para agitação contínua, foram aumentadas as diferenças entre os níveis mínimos e máximos das variáveis independentes, agitação e concentração de inóculo, visando testar níveis mais baixos de agitação e mais altos

de inóculo. Esses novos níveis permitirão atingir dois objetivos principais: a formação de esferoides com maior diferença de diâmetro e aumento do efeito da variável concentração de inóculo no estudo. A análise a seguir mostra os resultados obtidos com essas modificações.

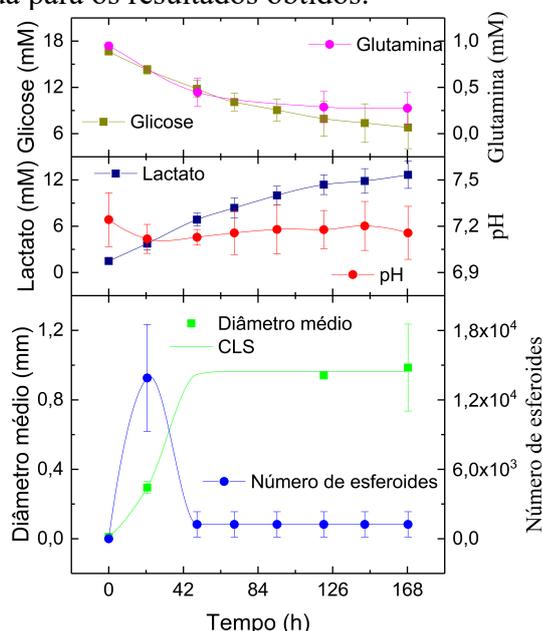
5.3 Grupo de experimentos para o DCCR

5.3.1 Análise do cultivo no TVB

Seguindo a tabela apresentada no item 4.4, os experimentos realizados foram os de inóculos variando de 1×10^5 até 10×10^5 células/mL e de agitação partindo de 60 até 120 rpm, testando 5 níveis diferentes de cada variável independente e realizando com triplicata do ponto central.

Na Figura 15 estão apresentados os resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina durante as 168 horas de cultivo da triplicata do ponto central de agitação a 100 rpm com inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. Cada experimento, com 24 horas de cultivo, apresentou esferoides de diâmetros médios de 0,32, 0,31 e 0,25 mm, e posteriormente com 168 h, o diâmetro passou para 1,00, 1,19 e 0,71 mm. O número de esferoides neste e nos demais cultivos foi obtido pela média entre as amostras disponíveis entre 72 e 168 horas de cultivo, já que o experimento a 111 rpm e $8,7 \times 10^5$ demonstrou a estabilidade desse número (vide Figura 18). Nenhum outro aminoácido além da glutamina, em todos os experimentos, apresentou consumo ou produção significativa (maior que 50%). Os níveis de lactato no meio de cultura nos 11 casos testados foram bem abaixo dos já relatados por causarem danos celulares, que é de aproximadamente 50 mM (ABU-ABSI et al., 2014).

Figura 15. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina da triplicata do ponto central do grupo de DCCR. Agitação constante a 90 rpm e inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.



Na Figura 16, estão apresentados os resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina durante as 168 horas de cultivo dos experimentos a 120 rpm e 60 rpm com inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. O nível maior de agitação produziu esferoides menores e com maior consumo de nutrientes.

Na Figura 17, estão apresentados os resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina durante as 168 horas de cultivo dos experimentos a 90 rpm com inóculo de 10×10^5 células/mL e 1×10^5 células/mL. O maior inóculo provocou a produção de esferoides menores, assim como o esperado maior consumo de nutrientes pela alta quantidade de células no biorreator.

Na Figura 18, estão apresentados os resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina durante as 168 horas de cultivo dos experimentos a 111 rpm com inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL e $2,3 \times 10^5$ células/mL. Esse nível de agitação combinado com o inóculo alto produziu os menores esferoides do grupo de DCCR.

Figura 16. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 120 rpm e inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. (B) Agitação constante a 60 rpm e inóculo de $5,5 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.

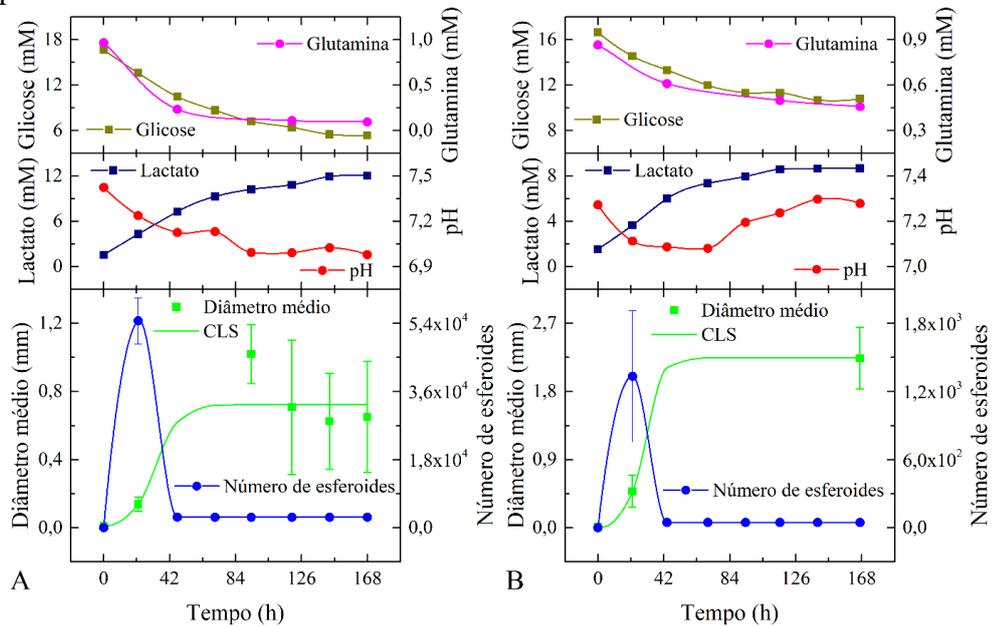


Figura 17. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 90 rpm e inóculo de 10×10^5 células/mL. (B) Agitação constante a 90 rpm e inóculo de 1×10^5 células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.

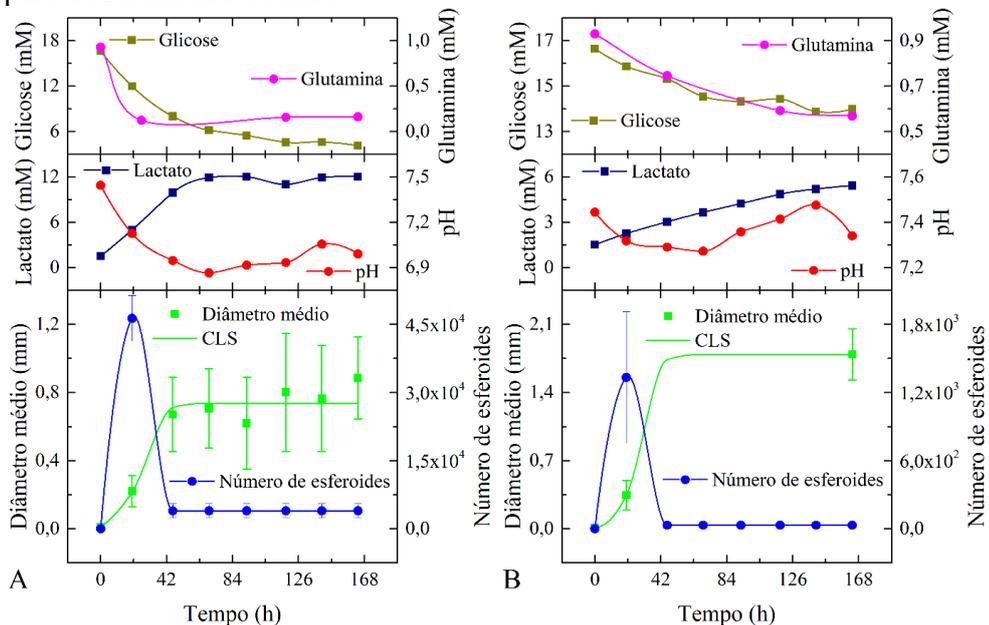
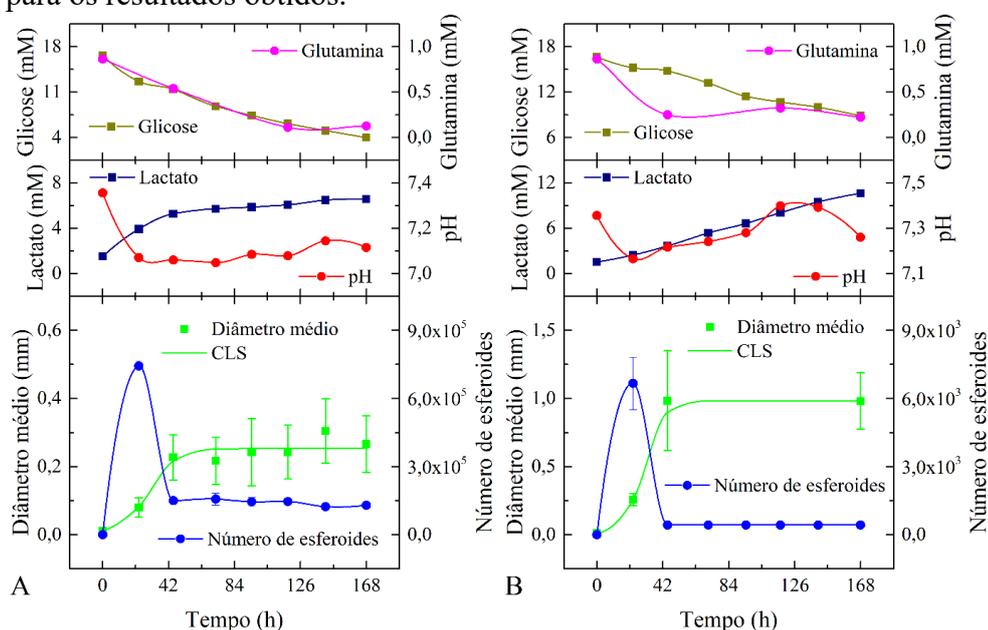


Figura 18. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 111 rpm e inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL. (B) Agitação constante a 111 rpm e inóculo de $2,3 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.



Na Figura 19, estão apresentados os resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina durante as 168 horas de cultivo dos experimentos a 69 rpm com inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL e $2,3 \times 10^5$ células/mL. Esse baixo nível de agitação produziu esferoides similares e maiores do que a triplicata central, o consumo de nutrientes foi maior no cultivo com maior inóculo como esperado.

As análises de nutrientes demonstraram que não houve esgotamento de nutrientes e podemos notar na Tabela 7 que depois das 72 horas de cultivo, a maioria dos cultivos apresentou uma queda no consumo de glicose ($50,2 \pm 23,3$ %) e glutamina ($67,7 \pm 12,4$ %), sendo que no cultivo estático, devido ao aumento no número de células o consumo de glicose aumentou 53,4%, enquanto que o consumo de glutamina só diminuiu 2,8% (Tabela 3).

Figura 19. Resultados de número de esferoides, diâmetro médio, níveis de pH, glicose, lactato e glutamina de dois experimentos do grupo de DCCR. (A) Agitação constante a 69 rpm e inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL. (B) Agitação constante a 69 rpm e inóculo de $2,3 \times 10^5$ células/mL. CLS indica o crescimento logístico simulado de acordo com a equação 4.6 ajustada para os resultados obtidos.

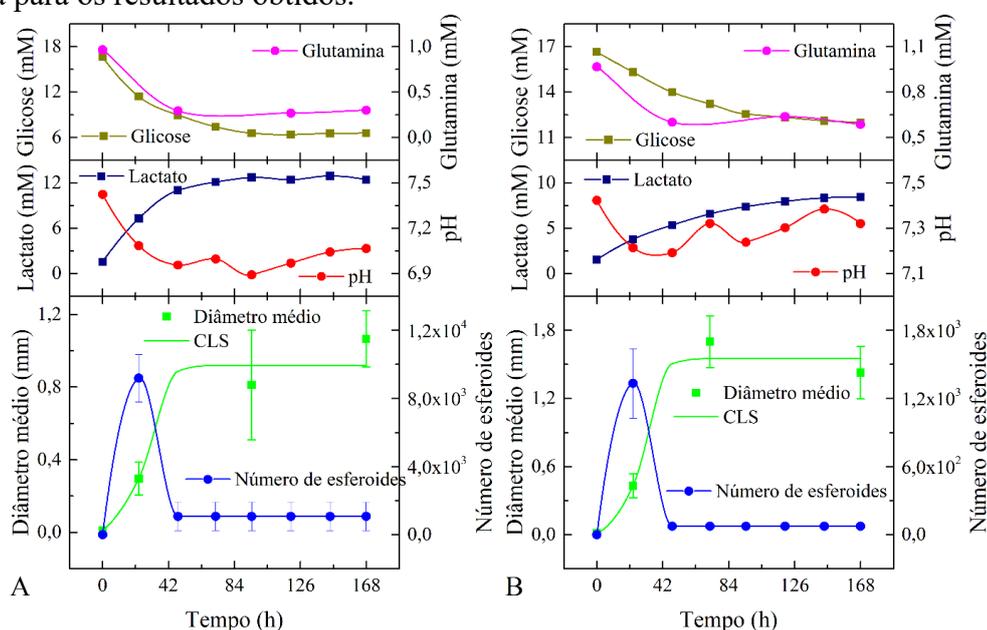


Tabela 7. Consumo dos principais substratos pela célula RT4 nos 11 cultivos do DCCR.

Experimentos (rpm/ $\times 10^5$ células/mL)	Consumo ($\times 10^{-3}$ mmol/hora)			
	Glicose		Glutamina	
	0-72h	96-168h	0-72h	96-168h
69/ 2,3	4,98 \pm 0,98	2,01 \pm 0,67	0,59 \pm 0,25	0,15 \pm 0,05
69/ 8,7	14,49 \pm 6,82	4,02 \pm 0,95	1,12 \pm 0,40	0,21 \pm 0,03
111/ 2,3	5,56 \pm 1,52	5,71 \pm 0,74	1,00 \pm 0,43	0,33 \pm 0,11
111/ 8,7	12,14 \pm 3,83	8,28 \pm 0,49	0,71 \pm 0,02	0,39 \pm 0,17
60/ 5,5	7,08 \pm 2,05	2,11 \pm 0,75	0,47 \pm 0,10	0,21 \pm 0,02
120/ 5,5	11,71 \pm 2,52	5,85 \pm 0,97	1,24 \pm 0,41	0,31 \pm 0,03
90/ 1	3,08 \pm 0,61	0,99 \pm 0,62	0,36 \pm 0,04	0,17 \pm 0,04
90/ 10	16,45 \pm 6,42	6,13 \pm 0,32	1,32 \pm 0,52	0,23 \pm 0,01
90/ 5,5	11,26 \pm 3,50	5,08 \pm 1,49	1,06 \pm 0,36	0,22 \pm 0,03
90/ 5,5	7,85 \pm 1,26	3,01 \pm 0,15	0,63 \pm 0,17	0,20 \pm 0,04
90/ 5,5	10,02 \pm 0,39	7,65 \pm 0,83	0,94 \pm 0,21	0,35 \pm 0,07

É possível supor que o consumo teve queda pelo provável mudança de metabolismo das células localizadas mais internamente no esferoide, de célula em estado de proliferação

para um estado de quiescência ou apoptose, como já foi relatado em literatura para outras células tumorais em formato de esferoides multicelulares (ZANONI et al., 2016).

Em todos os 11 cultivos do DCCR houve agregação celular partindo das células primárias inoculadas no começo dos experimentos. Como as células, nas primeiras 24 horas de cultivo, encontram-se em condições favoráveis de crescimento cabe esperar que proliferem de forma parecida ao cultivo em placas de poços. Nos experimentos realizados a quantificação do crescimento celular foi muito difícil devido à perda de viabilidade celular causado pelo tratamento enzimático com tripsina na etapa de dissociação dos agregados da célula RT4. Como a quantificação da concentração celular é de vital importância para o acompanhamento dos experimentos de cultivo houve necessidade de utilizar o fator de rendimento $Y_{x/gli}$ que, como demonstrado, pode ser considerado constante quando a célula está crescendo exponencialmente (BYLUND et al., 1998). Ou seja, o consumo de glicose no meio de cultura pode servir como medida equivalente da quantidade de célula RT4 produzida.

Na Figura 20 estão apresentados os dados estimados de crescimento obtidos através do cálculo de células geradas usando o valor de $Y_{x/gli}$ obtido no cultivo estático, assim como os dados obtidos de contagem de células viáveis depois de dissociar os esferoides com tripsina e EDTA. As diferenças entre os valores se devem possivelmente à morte celular causada pelo processo de dissociação enzimática. Analisando os valores de velocidade de crescimento obtidas com os dados estimados (Tabela 8), obtiveram-se valores ($0,020 \pm 0,04$) similares ao cultivo estático ($0,025 \pm 0,001$) somente até 48 horas de cultivo, quando a velocidade de crescimento específico cai ($78,4 \pm 8,3\%$), indicando uma mudança para uma fase de crescimento mais lento. Nesta fase os agregados atingem tamanhos grandes que limitam bastante a entrada de nutrientes para o interior dos mesmos. Isto faz com que as células no centro dos agregados entrem em apoptose e outras, nas camadas intermediárias dos agregados, entrem num estado quiescente, de baixo consumo de glicose. As células bem próximas à superfície dos agregados devem continuar crescendo e consumindo glicose normalmente. Em resumo, o consumo de glicose na segunda fase dos cultivos representa uma situação bastante limitada de crescimento e, portanto, menos confiável que a primeira fase.

Figura 20. Valores de número de células obtidos com contagem do número de células dissociadas viáveis (NCDV) e número de células estimados (NCS) pelo uso do $Y_{x/gli}$. (A) 69 rpm, $8,7 \times 10^5$ células/mL. (B) 60 rpm, $5,5 \times 10^5$ células/mL. (C) 60 rpm, $2,3 \times 10^5$ células/mL. (D) 90 rpm, 10×10^5 células/mL. (E) 90 rpm, $5,5 \times 10^5$ células/mL. (F) 90 rpm, 1×10^5 células/mL. (G) 111 rpm, $8,7 \times 10^5$ células/mL. (H) 120 rpm, $5,5 \times 10^5$ células/mL. (I) 111 rpm, $2,3 \times 10^5$ células/mL.

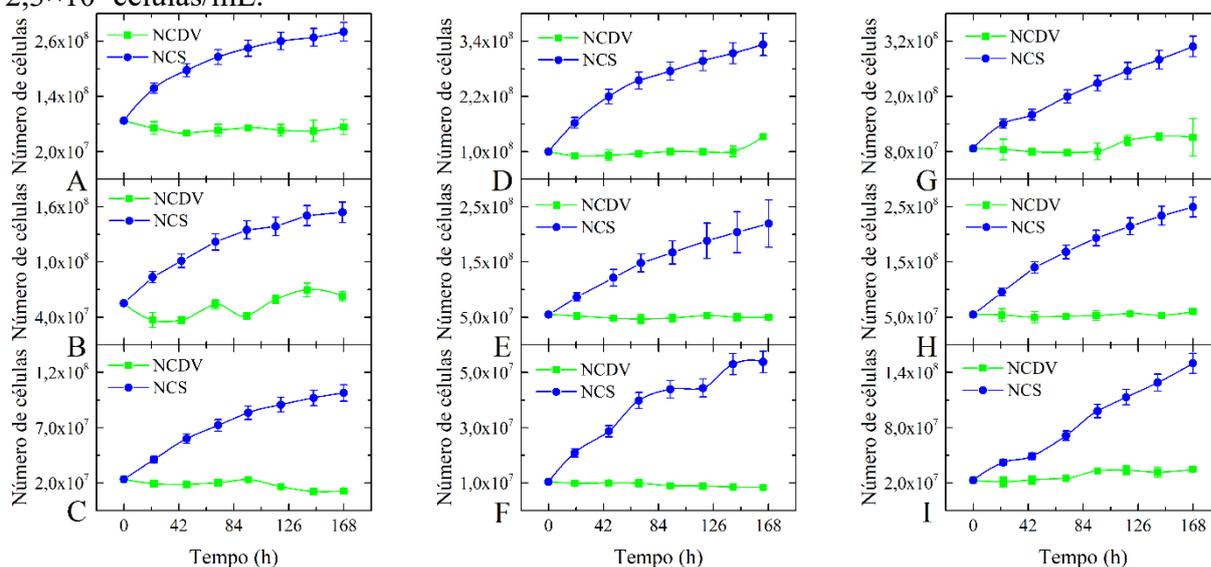


Tabela 8. Velocidade específica de crescimento da célula RT4 nos 11 cultivos do DCCR.

Experimentos (rpm/ $\times 10^5$ células/mL)	0-48h		72-168h	
	μ (h^{-1})	Tempo de duplicação (h)	μ (h^{-1})	Tempo de duplicação (h)
69/ 2,3	0,021 \pm 0,012	33,3	0,004 \pm 0,002	184,6
69/ 8,7	0,019 \pm 0,014	36,7	0,003 \pm 0,001	271,4
111/ 2,3	0,021 \pm 0,014	33,4	0,008 \pm 0,004	87,3
111/ 8,7	0,015 \pm 0,010	45,2	0,005 \pm 0,001	146,4
60/ 5,5	0,015 \pm 0,008	47,6	0,003 \pm 0,002	257,7
120/ 5,5	0,021 \pm 0,012	32,8	0,004 \pm 0,002	163,8
90/ 1	0,028 \pm 0,019	24,9	0,004 \pm 0,003	180,0
90/ 10	0,019 \pm 0,012	37,1	0,003 \pm 0,001	223,3
90/ 5,5	0,021 \pm 0,012	33,7	0,004 \pm 0,002	181,3
90/ 5,5	0,015 \pm 0,006	46,3	0,003 \pm 0,002	207,9
90/ 5,5	0,017 \pm 0,006	41,0	0,006 \pm 0,002	122,3

5.3.2 Análise do efeito das variáveis independentes

Os principais resultados de todos os experimentos desse grupo de DCCR estão apresentados na Tabela 9 e Tabela 11. Os efeitos calculados e a sua relevância estatística estão apresentados nas Tabela 10 e Tabela 12. O CV e a circularidade dos esferoides produzidos foi em média de $33,1 \pm 8,8$ e $85,3 \pm 1\%$, em 24 horas e $24,0 \pm 9,5$ e $82,2 \pm 4,7$, em 168 horas.

Tabela 9. Resultados do grupo de experimentos do DCCR com 24 horas de cultivo.

Experimentos (rpm/ $\times 10^5$ células/mL)	Número de Esferoides	Diâmetro médio (mm)	CV (%)	Circularidade (%)
69/ 2,3	1333 \pm 306	0,43 \pm 0,10	24,3	84,5 \pm 7,0
69/ 8,7	9192 \pm 1404	0,30 \pm 0,09	30,8	85,5 \pm 4,4
111/ 2,3	6667 \pm 1155	0,26 \pm 0,05	18,0	84,7 \pm 7,3
111/ 8,7	743333 \pm 23352	0,08 \pm 0,03	34,4	84,3 \pm 7,1
60/ 5,5	1333 \pm 577	0,48 \pm 0,21	44,4	85,7 \pm 6,1
120/ 5,5	54667 \pm 6110	0,14 \pm 0,04	29,3	85,9 \pm 5,2
90/ 1	1333 \pm 577	0,34 \pm 0,15	43,8	84,0 \pm 6,3
90/ 10	46333 \pm 5033	0,22 \pm 0,09	42,3	87,6 \pm 4,9
90/ 5,5	12667 \pm 2887	0,32 \pm 0,12	37,6	86,2 \pm 7,1
90/ 5,5	10000 \pm 3512	0,31 \pm 0,11	36,4	85,2 \pm 8,0
90/ 5,5	19000 \pm 1000	0,25 \pm 0,06	23,2	84,7 \pm 5,5

Tabela 10. Valores dos coeficientes lineares e quadráticos de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do DCCR com 24 horas de cultivo. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. L = coeficiente linear. Q = coeficiente quadrático. Coef = coeficiente.

	Número de esferoides $R^2 = 0,655$		Diâmetro médio $R^2 = 0,941$		CV $R^2 = 0,245$		Circularidade $R^2 = 0,431$	
	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p
IT	13889	0,900	0,29	0,000*	32,4	0,004*	85,4	0,000*
AL	101863	0,176	-0,11	0,001*	-3,0	0,470	-0,1	0,828
AQ	48109	0,559	0,00	0,934	-1,0	0,829	-0,0	0,925
IL	101021	0,179	-0,06	0,008*	2,6	0,529	0,7	0,128
IQ	46026	0,576	-0,01	0,454	2,1	0,672	-0,0	0,925
AI	182202	0,103	-0,01	0,556	2,5	0,668	-0,3	0,554

* $p < 0,05$

Tabela 11. Resultados do grupo de experimentos do DCCR ao final de 168 horas de cultivo.

Experimentos (rpm/ ×10 ⁵ células/mL)	Número de Esferoides	Diâmetro médio (mm)	CV (%)	Circularidade (%)
69/ 2,3	75	1,55±0,23	16,3	76,5±10,8
69/ 8,7	1078±832	0,92±0,16	16,9	87,2±7,6
111/ 2,3	423±99	0,98±0,21	21,1	84,5±5,1
111/ 8,7	105058±7467	0,25±0,08	32,8	84,0±6,6
60/ 5,5	45	2,24±0,41	18,2	78,2±9,4
120/ 5,5	2740±388	0,72±0,28	39,0	85,7±5,6
90/ 1	30	1,79±0,26	14,7	71,7±9,1
90/ 10	3924±1554	0,74±0,24	32,7	83,8±5,3
90/ 5,5	720±494	1,00±0,18	17,7	83,9±4,2
90/ 5,5	503±605	1,19±0,20	16,8	82,9±5,5
90/ 5,5	2500±1650	0,71±0,27	37,9	85,5±5,2

Tabela 12. Valores dos coeficientes lineares e quadráticos de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do DCCR com 168 horas de cultivo. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. L = coeficiente linear. Q = coeficiente quadrático. Coef = coeficiente.

	Número de esferoides R ² = 0,617		Diâmetro médio R ² = 0,805		CV R ² = 0,607		Circularidade R ² = 0,846	
	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p
IT	1241	0,941	0,97	0,005**	24,1	0,004**	84,1	0,000**
AL	13517	0,222	-0,42	0,019**	6,3	0,089*	1,9	0,091*
AQ	6319	0,608	0,14	0,374	1,1	0,761	-0,3	0,812
IL	13893	0,212	-0,36	0,036**	4,7	0,174	3,4	0,014**
IQ	6611	0,592	0,04	0,812	-1,3	0,727	-2,4	0,083*
AI	25908	0,118	-0,02	0,893	2,8	0,539	-2,8	0,085*

* p < 0,1 ** p < 0,05

A fórmula que calcula o efeito previsto das variáveis dependentes é:

$$VP = IT + AL N_A + AQ N_A^2 + IL N_I + IQ N_I^2 + AI N_A N_I \quad (5.2)$$

Com os resultados obtidos, se tornou possível realizar uma análise dos efeitos de cada variável. Apenas 3 dos parâmetros resposta escolhidos (diâmetro médio as 24 horas, 72 horas e circularidade as 72 horas) tiveram 2 ou mais efeitos com valor-p menor que 0,05 ou 0,1, ou seja, chance da diferença ser ao acaso menor que 5% ou 10%. Mostrando o efeito que o

aumento da agitação e do inóculo tem de diminuir o diâmetro médio do esferoide produzido, além do efeito de aumentar a circularidade do esferoide as 72 horas de cultivo. Como o foco desse estudo é sugerir uma nova plataforma de produção de esferoides, foi realizada o cálculo do valor de produtividade (número de esferoides dividido pelo tempo de cultivo) e seu logaritmo natural para análise do efeito das variáveis independentes nesses valores obtidos nos 11 experimentos. Esses valores são apresentados na Tabela 13. Os efeitos calculados e a sua relevância estatística estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 13. Resultados da produtividade do grupo de experimentos do DCCR as 24 e 72 horas de cultivo. Prod.= Produtividade.

Experimentos (rpm/ ×10 ⁵ células/mL)	Prod. -24 h Esferoides/h	Ln (Prod. -24 h)	Prod. -72 h Esferoides/h	Ln (Prod. -72 h)
69/ 2,3	57,97	4,06	1,04	0,04
69/ 8,7	399,65	5,99	14,97	2,71
111/ 2,3	289,85	5,67	5,98	1,79
111/ 8,7	32318,84	10,38	1459,14	7,29
60/ 5,5	53,03	3,97	0,64	-0,44
120/ 5,5	2493,20	7,82	38,59	3,65
90/ 1	67,42	4,21	0,43	-0,83
90/ 10	2316,67	7,75	56,87	4,04
90/ 5,5	550,72	6,31	10,00	2,30
90/ 5,5	476,19	6,17	7,19	1,97
90/ 5,5	904,76	6,81	35,71	3,58

Com base na equação 5.2 e no bom ajuste da variação do diâmetro médio e produtividade em escala logarítmica natural em 24 e 72 horas de cultivo, foi possível montar as Figura 21, Figura 22, Figura 23 e Figura 24 Com a análise das imagens e dos conjuntos de dados, levando em consideração a relevância estatística, pode-se verificar que aumentar o nível de agitação e concentração do inóculo tende a produzir mais esferoides (Figura 22 e Figura 24), assim como diminui o tamanho do esferoide produzido (Figura 21 e Figura 23).

Tabela 14. Valores dos coeficientes lineares e quadráticos de efeito obtidos com o software STATISTICA no conjunto de experimento do DCCR. A = variável independente agitação. I = variável independente inóculo. IT = Intercepto/média. L = coeficiente linear. Q = coeficiente quadrático. Coef = coeficiente. Prod.= Produtividade.

	Produtividade -24 h		Ln(Prod. -24 h)		Produtividade -72 h		Ln(Prod. -72 h)	
	R ² = 0,662		R ² = 0,965		R ² = 0,618		R ² = 0,902	
	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p	Coef.	Valor-p
IT	644	0,893	6,43	0,000**	17,6	0,939	2,62	0,007**
AL	4450	0,170	1,43	0,001**	187,8	0,221	1,51	0,009**
AQ	2073	0,558	-0,12	0,602	88,5	0,608	-0,17	0,714
IL	4444	0,170	1,46	0,000**	193,4	0,210	1,88	0,004**
IQ	2033	0,566	-0,08	0,732	92,0	0,590	-0,17	0,713
AI	7922	0,100*	0,70	0,041**	359,8	0,117	0,71	0,228

* p < 0,1 ** p < 0,05

Figura 21. Superfície ajustada da variação do diâmetro médio com 24 horas de cultivo.

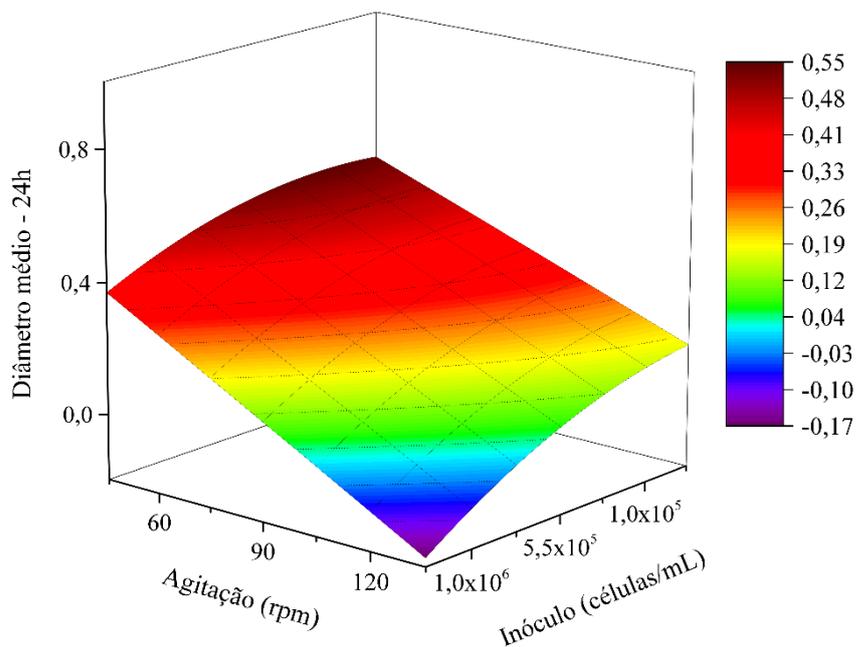


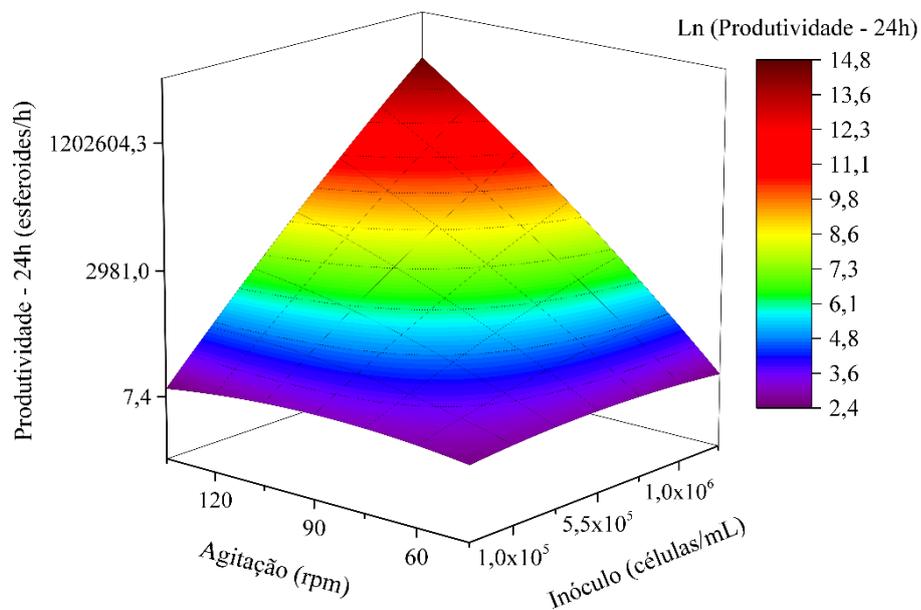
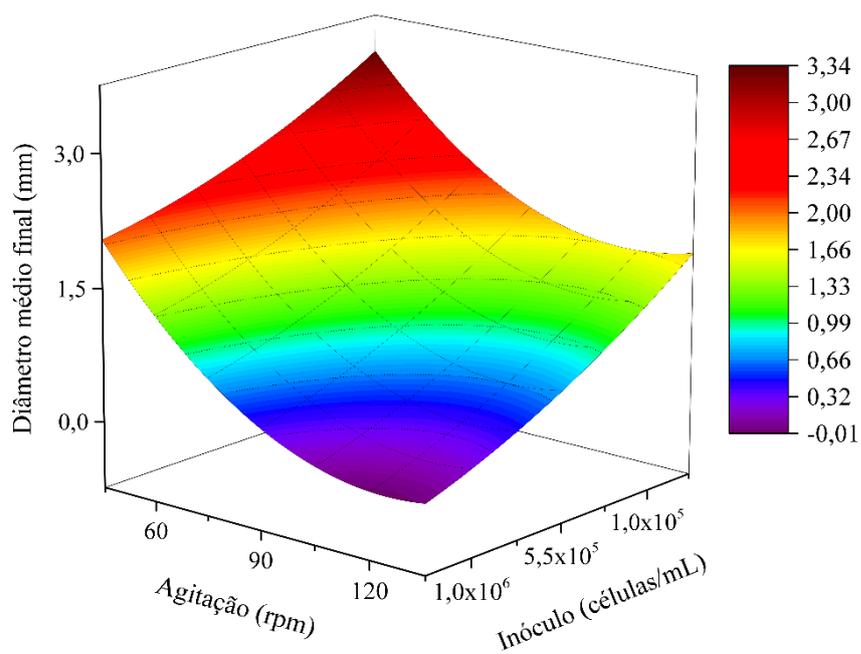
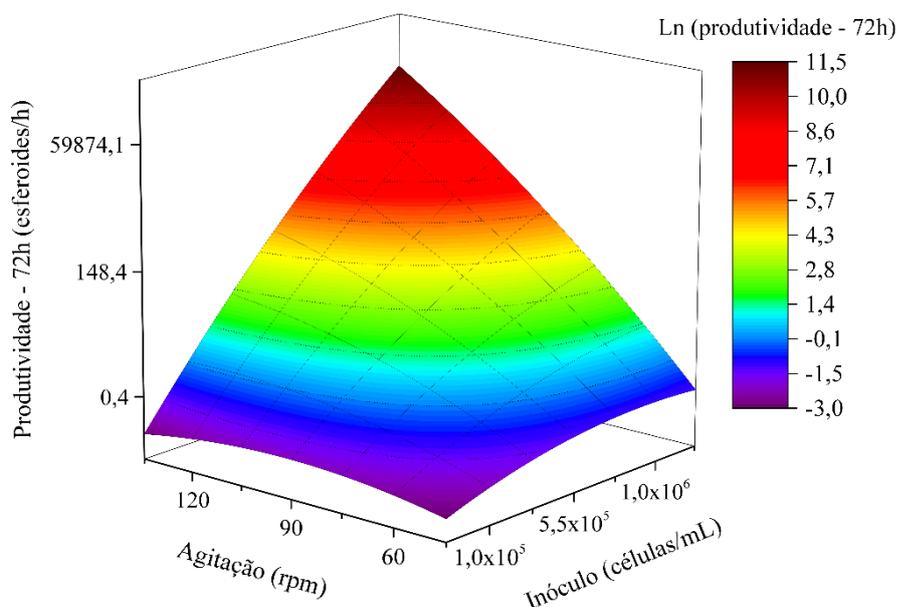
Figura 22. Superfície ajustada da variação da produtividade com 24 horas de cultivo.**Figura 23.** Superfície ajustada da variação do diâmetro médio final (estabilizado depois de 72 horas de cultivo).

Figura 24. Superfície ajustada da variação da produtividade com 72 horas de cultivo.

Com os resultados bem significativos da variação do diâmetro médio com 72 horas de cultivo (Figura 23), foi possível montar um modelo em valores reais de agitação e concentração de inóculo, sendo possível usar esse modelo para prever a formação de esferoides em níveis não testados no DCCR. A equação gerada para a previsão do diâmetro médio (DM_{72h} , mm) é:

$$DM_{72h} = 5,94 - \frac{7,64}{10^2} A + \frac{3,25}{10^4} A^2 - \frac{1,21}{10^6} I + \frac{3,79}{10^{13}} I^2 - \frac{3,64}{10^9} A I \quad (5.3)$$

onde:

A = agitação (rpm)

I = concentração do inóculo (células/mL)

Com os resultados da variação da produtividade (Figura 24), foi possível montar um modelo em valores reais de agitação e concentração de inóculo, sendo possível usar esse modelo para prever a formação de esferoides em níveis não testados no DCCR. A equação gerada para a previsão do logaritmo natural da produtividade (P_{72h} , esferoides/h) é:

$$\ln(P_{72h}) = -5,39 + \frac{8,05}{10^2} A - \frac{3,68}{10^4} A^2 - \frac{1,61}{10^6} I - \frac{1,65}{10^{12}} I^2 + \frac{1,03}{10^7} A I \quad (5.4)$$

Ao final de todos os experimentos, o resultado mais interessante foi a obtenção de esferoides de 0,3 até 2,5 mm de diâmetro, mostrando a versatilidade do biorreator na

formação de esferoides de células RT4, além da produtividade alta caso sejam aplicados altos níveis de agitação e inóculo. A Figura 25 ilustra bem a forma dos esferoides com 24 horas de cultivo e a Figura 26, esferoides com 168 horas de cultivo.

Adicionalmente, em alguns dos experimentos realizados (especialmente com agitação maior que 90 rpm) foi observado a formação de microesferoides de diâmetros médios menores que 100 μm (Figura 27). Apesar destes esferoides não terem sido formados em todos os experimentos, o que impossibilitou a análise no DCCR, os mesmos demonstram o potencial do biorreator em formar esferoides de tamanhos bem pequenos e em grande quantidade (a média obtida por experimento foi próxima de 25000).

Figura 25. Fotos dos esferoides em formação para cada experimento com 24 horas de cultivo, seus níveis de agitação, inóculo, valores médios \pm desvio padrão dos diâmetros.

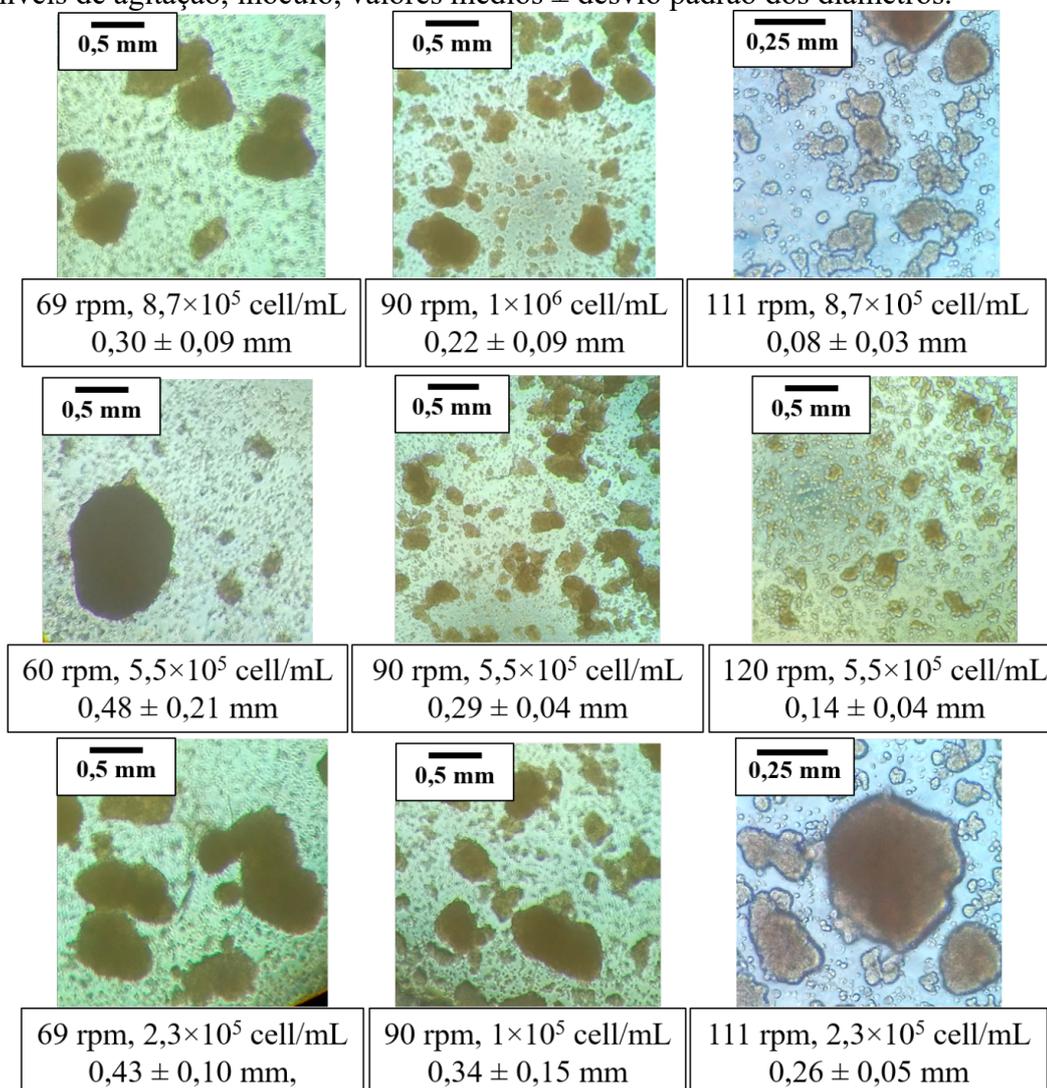


Figura 26. Fotos dos esferoides formados para cada experimento com 168 horas de cultivo, seus níveis de agitação, inóculo, valores médios \pm desvio padrão dos diâmetros.

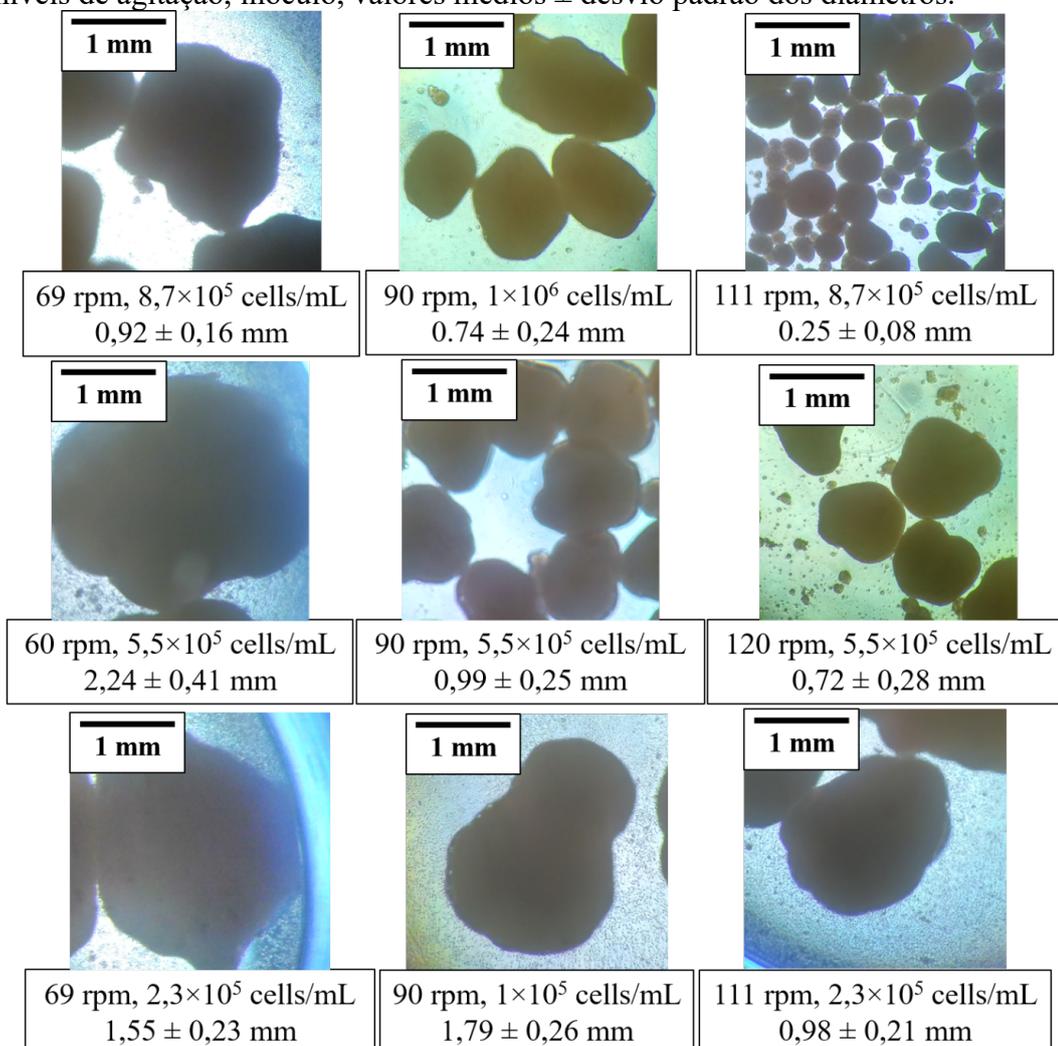
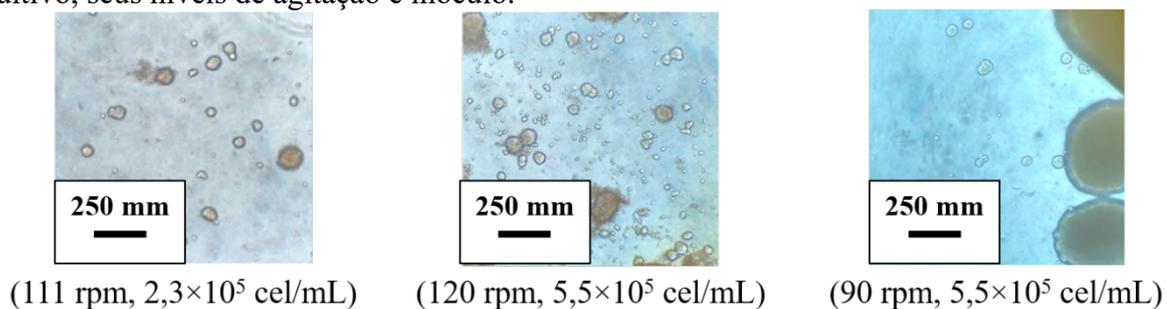


Figura 27. Fotos dos microsferoides formados para cada experimento com 168 horas de cultivo, seus níveis de agitação e inóculo.



O processo de agregação de células RT4 no TVB mostrou duas etapas. Na primeira a maioria das partículas primárias (células) se agregam num tempo aproximado de 24 horas formando grandes quantidades de esferoides pequenos cujo diâmetro depende da agitação e concentração de inóculo utilizadas no cultivo. Na segunda, num intervalo de 24 à 72 horas, os agregados formados dão origem a um número reduzido de novos agregados de maior tamanho, que podem chegar a diâmetros médios da ordem de 2,2 mm.

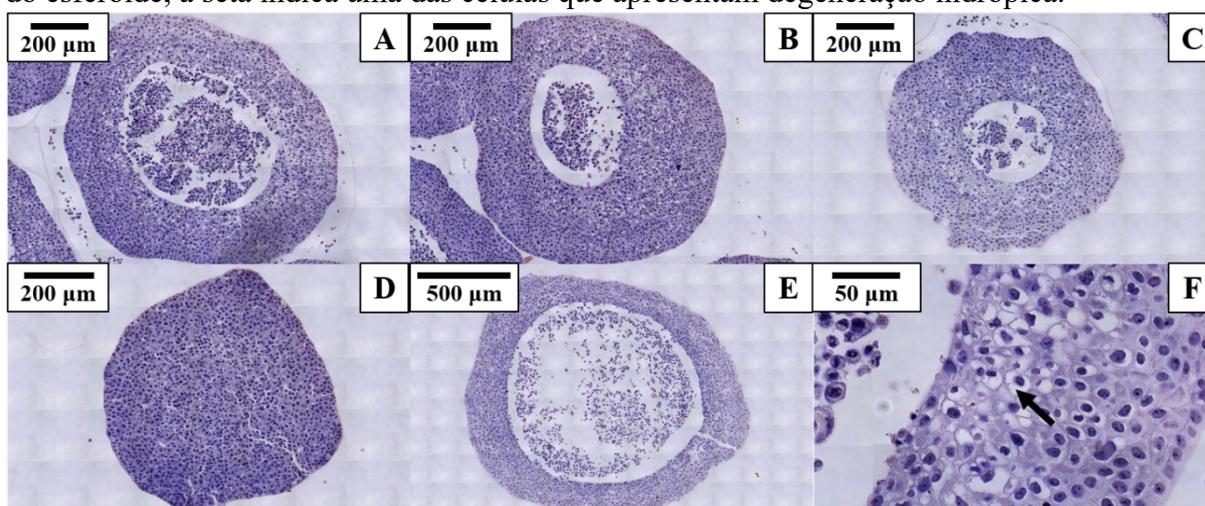
5.4 Cultivo adicional e imagens de cortes histológicos

Após o término dos experimentos do grupo do DCCR, foi realizado um cultivo celular adicional com agitação de 100 rpm e inóculo de 2×10^5 células/mL, obtendo, em 72 horas, esferoides de diâmetro médio de 1,46 ($\pm 0,39$), sendo que a equação 5.3 prevê um esferoide de diâmetro médio de 1,25 mm, resultando em um erro de 17,1% entre o observado e o previsto. Essa diferença possivelmente se deve ao fato de que esferoides produzidos no cultivo teste, sem retirada de amostras prévias, podem atingir diâmetros maiores por causa do maior número de esferoides presentes no momento da amostragem. A quantidade de esferoides produzidos foi de 67, sendo que a equação 5.4 prevê a produção de 140 esferoides, resultando em um erro de 52,2% entre o observado e o previsto. Este erro pode ser explicado pela imprecisão do modelo estatístico, uma vez que as medidas de número de agregados, na prática, ficou sujeita a muita variabilidade na amostragem. Tendo em vista que no DCCR foram produzidos uma ampla faixa de esferoides, indo de 30 até 100000 esferoides, com diâmetro médio de 0,25 à 2,25 mm, o modelo de previsão proposto neste estudo conseguiu se aproximar de forma razoável aos resultados obtidos no experimento adicional.

Com esses esferoides foi realizado o processo de montagem de lâminas de cortes para analisar a estrutura interna do esferoide usando os corantes hematoxilina e eosina (Figura 28). Com as imagens obtidas pode-se observar o que provavelmente é a zona necrótica dentro dos esferoides, corroborando com os relatos na literatura de que esferoides deste tamanho apresentam centro necrótico, pois tem mais de 500-600 μm de diâmetro (SANT; JOHNSTON, 2017; ZANONI et al., 2016). Na Figura 28F, pode-se ver sinais de degeneração hidrópica, ou seja, acúmulo intracelular de água (ABDELHALIM; JARRAR, 2011; YORITA et al., 2016), o que pode ser um indicativo de dano celular potencialmente causado pela baixa concentração

de nutrientes ou acúmulo de metabolitos, à quais células mais internas do esferoide são submetidas, adicionalmente, células localizadas no centro apresentam núcleos (cor azul mais escura) disformes, corroborando com a suspeita de zona necrótica, que pode ser confirmada com o uso de corantes mais específicos em um trabalho futuro.

Figura 28. Imagens obtidas dos cortes de esferoides. A, B e C são originárias do mesmo esferoide, os cortes têm aproximadamente 1 mm de diâmetro, mas são de diferentes alturas do esferoide. D mostra um corte que de 0,7 mm de diâmetro, E tem 1,4 mm de diâmetro. Na F pode-se ver as diferenças nas fisionomias das células à medida que se afastam da superfície do esferoide, a seta indica uma das células que apresentam degeneração hidrópica.



5.5 Comparação com plataformas comerciais

Em seguida, os resultados obtidos no experimento com agitação de 111 rpm e inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL foram comparados com duas alternativas comerciais citadas na literatura, uma placa de poços de baixa aderência e uma placa para formação de esferoides por gota suspensa (CHATZINIKOLAIDOU, 2016; PATEL et al., 2015) na Tabela 15. Apesar de ser uma comparação simplificada, demonstra o potencial que o sistema possui mesmo com a limitação em relação a heterogeneidade dos esferoides formados. Pois, mesmo que seja necessário descartar parte da população de esferoides para a seleção de tamanhos específicos, ainda economizaria a necessidade de manipulação na pipetagem e insumo de alto custo. Os cálculos são válidos para um TVB de 100 mL, sendo possível aumentar essa escala, sem prejudicar o padrão de agitação interno do biorreator. Na comparação também não foi

considerado que o biorreator pode ser reutilizado por ser feito de materiais que possibilitam autoclavagem.

A heterogeneidade entre os esferoides ainda é uma desvantagem da agregação no TVB, assim como em outros sistemas já relatados (NATH; DEVI, 2016), porém avaliando os resultados do DCCR, pode-se afirmar que o sistema apresenta uma alta flexibilidade, produzindo esferoides numa ampla faixa de tamanhos. Essa flexibilidade é uma vantagem, pois esferoides pequenos são importantes para plataformas de testes de fármacos e aplicações na engenharia de tecidos. Porém, esferoides com tamanhos de diâmetro superiores a 500 μm foram citados na literatura como importantes para determinadas pesquisas por comumente apresentar centro necrótico similar aos tumores *in vivo* (ZANONI et al., 2016).

Tabela 15. Análise de custo para a produção do lote de aproximadamente 100 mil esferoides de aproximadamente 250 μm de diâmetro no biorreator deste estudo contra plataformas disponíveis no mercado atual.

	Biorreator Taylor de 100 mL	Placa de poços ULA (Ultra low attachment, adesão ultrabaixa)	Perfecta3D®
Quantidade de esferoides produzidos em um cultivo por equipamento	100000	384	384
Custo total de equipamento para produzir o lote (R\$)	1×800	260×240	260×175
Custo da mão de obra para o inóculo + recuperação (R\$)	2(h)×100	260×0,25(h)×100	260×0,25(h)×100
Custo de preparo/limpeza do equipamento (R\$)	600	0 (descartável)	0 (descartável)
Custo total estimado (R\$)	1500	68900	52000
Fabricante	UFSCar	Corning®	3D Biomatrix®

Com base nos resultados obtidos até o momento foi possível analisar de forma satisfatória o potencial do TVB em formar esferoides, apesar dos resultados ainda serem

limitados a um tipo de célula, definitivos, os mesmos já sugerem que o TVB é capaz de competir com outras plataformas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam que o TVB foi capaz de gerar esferoides multicelulares de células tumorais RT4 com as características geométricas apropriadas para uso na avaliação de eficácia de fármacos.

As análises dos planejamentos experimentais realizados confirmam que as variáveis agitação e concentração de inóculo são de alta relevância no processo de agregação da célula RT4 e que, uma combinação de ambas, pode levar a valores otimizados de produtividade de esferoides da ordem de 3.000 esferoides/h·mL com diâmetro médio e circularidade da ordem de 80 μ m e 84%, respectivamente (resultados do cultivo com agitação em 111 rpm e inóculo de $8,7 \times 10^5$ células/mL). Valores de produtividade como este tornam o TVB um excelente candidato para ser utilizado na produção em larga escala de esferoides de células como a RT4.

Manipulando as condições operacionais do TVB como agitação, concentração de inóculo e o tempo de cultivo é possível produzir esferoides de tamanhos desejáveis para aplicações específicas na avaliação de eficácia e toxicidade de fármacos. Esta flexibilidade do TVB pode ser vista como uma vantagem importante sobre outras plataformas convencionais de produção de esferoides. A circularidade, como parâmetro de qualidade dos esferoides produzidos, embora possam ser considerada boa, ainda precisa ser melhorada para poder atender a necessidade de novas aplicações específicas na área biomédica (valores acima de 90%).

6.1 Sugestões para trabalhos futuros

- a) Fazer um levantamento dos dados cinéticos da formação de esferoides da célula RT4 no TVB.
- b) Aprimorar técnicas para quantificação de células e de viabilidade celular nos esferoides.
- c) Testar o TVB na produção de esferoides utilizando outros tipos de células tumorais.

REFERÊNCIAS

ABBASALIZADEH, S. et al. Bioprocess Development for Mass Production of Size-Controlled Human Pluripotent Stem Cell Aggregates in Stirred Suspension Bioreactor. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 18, n. 11, p. 831–851, 2012.

ABDELHALIM, M. A. K.; JARRAR, B. M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, 2011.

ABU-ABSI, S. et al. Cell culture process operations for recombinant protein production. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 139, p. 35–68, 2014.

ALEMANY-RIBES, M.; SEMINO, C. E. Bioengineering 3D environments for cancer models. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 79, p. 40–49, 2014.

ALESHCHEVA, G. et al. Scaffold-free Tissue Formation Under Real and Simulated Microgravity Conditions. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 119, p. 26–33, 2016.

ANVISA. **Institucional**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/institucional>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

AYAZI SHAMLOU, P. et al. Growth-independent breakage frequency of protein precipitates in turbulently agitated bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 16, p. 2647–2656, 1994.

AYUSO, J. M. et al. Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment. **Scientific Reports**, v. 6, p. 36086, 2016.

AZARIN, S. M.; PALECEK, S. P. Development of scalable culture systems for human embryonic stem cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 378–384, 2010.

BABJUK, M. et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. **European Urology**, v. 71, p. 447–461, 2016.

BRASIL Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2017. 128 p.

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.

BYLUND, F. et al. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. **Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 3, p. 171–180, 1998.

CHANDRASEKARAN, S. et al. Effect of homotypic and heterotypic interaction in 3D on the E-selectin mediated adhesive properties of breast cancer cell lines. **Biomaterials**, v. 33, n. 35, p. 9037–9048, 2012.

CHANG, T. T.; HUGHES-FULFORD, M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. **Tissue engineering. Part A**, v. 15, n. 3, p. 559–567, 2009.

CHATZINIKOLAIDOU, M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 9, p. 1553–1560, 2016.

CRISTINA, E. et al. Uso de técnicas de análise histológica e imunohistoquímica em Odontologia. **Arch Health Invest**, v. 2, n. 21, p. 40–49, 2013.

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.

DECAUDIN, D. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer. **Anti-cancer drugs**, v. 22, n. 9, p. 827–841, 2011.

DHERBÉCOURT, D. et al. Experimental study of enhanced mixing induced by particles in Taylor-Couette flows. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 108, p. 109–117, 2016.

EGLIN, R. M.; RANDLE, D. H. Drug Discovery Goes Three-Dimensional: Goodbye to Flat High-Throughput Screening? **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 13, n. 5, p. 262–265, 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FRANSEN, S. K. et al. Calcium electroporation: Evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–11, 2015.

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.

HAY, M. et al. Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 40–51, 2014.

HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 136, n. 1, p. 65–74, 1984.

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.

HIRSCHHAEUSER, F. et al. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3–15, 2010.

HO, W. Y. et al. Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

HOARAU-VÉCHOT, J. et al. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 181, 2018.

HUNT, M. M. et al. Factorial Experimental Design for the Culture of Human Embryonic Stem Cells as Aggregates in Stirred Suspension Bioreactors Reveals the Potential for Interaction Effects Between Bioprocess Parameters. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 1, p. 76–89, 2014.

INGRAM, M. et al. Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 33, n. 6, p. 459–466, 1997.

JUNOD, S. W. **FDA and Clinical Drug Trials: A Short History**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/History/Overviews/ucm304485.htm>>. Acesso em: 24 jan. 2017.

KLOTZ, L.; BRAUSI, M. A. World urologic oncology federation bladder cancer prevention program: A global initiative. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 33, n. 1, p. 25–29, 2015.

KONG, B.; SHANKS, J. V.; VIGIL, R. D. Enhanced Algal Growth Rate in a Taylor Vortex Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 8, p. 2140–2149, 2013.

KOSHKIN, V. et al. Metabolic Suppression of a Drug-Resistant Subpopulation in Cancer Spheroid Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 1, p. 59–65, 2016.

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.

LATHROP, D. P.; FINEBERG, J.; SWINNEY, H. L. Transition to shear-driven turbulence in Couette-Taylor flow. **Physical Review A**, v. 46, n. 10, p. 6390–6405, 1992.

LAWSON, T. et al. Process Development for Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells in a 50L Single-use Stirred Tank Bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 49–62, 2016.

LERNER, S. P.; ROBERTSON, A. G. Molecular Subtypes of Non-muscle Invasive Bladder Cancer. **Cancer Cell**, v. 30, n. 1, p. 1–3, 2016.

LIM, T. T.; TAN, K. S. A note on power-law scaling in a Taylor-Couette flow. **Physics of Fluids**, v. 16, n. 1, p. 140–144, 2004.

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.

MEHESZ, A. N. et al. Scalable robotic biofabrication of tissue spheroids. **Biofabrication**, v. 3, n. 2, p. 1–8, 2011.

MOLLET, M. et al. Bioprocess equipment: Characterization of energy dissipation rate and its potential to damage cells. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, p. 1437–1448, 2004.

MOLLET, M. et al. Computer simulations of the energy dissipation rate in a fluorescence-activated cell sorter: Implications to cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 260–272, 2008.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 163, p. 94–108, 2016.

NELSON, L. J. et al. Low-shear modelled microgravity environment maintains morphology and differentiated functionality of primary porcine hepatocyte cultures. **Cells Tissues Organs**, v. 192, n. 2, p. 125–140, 2010.

NEMRI, M.; CHARTON, S.; CLIMENT, E. Mixing and axial dispersion in Taylor-Couette flows: The effect of the flow regime. **Chemical Engineering Science**, v. 139, p. 109–124, 2016.

PATEL, N. R. et al. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. **Therapeutic delivery**, v. 6, n. 4, p. 509–20, 2015.

RACINA, A.; KIND, M. Specific power input and local micromixing times in turbulent Taylor-Couette flow. **Experiments in Fluids**, v. 41, n. 3, p. 513–522, 2006.

RAGHAVAN, S. et al. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. **Gynecologic Oncology**, v. 138, n. 1, p. 181–189, 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.

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

SANT, S.; JOHNSTON, P. A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 27–36, 2017.

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.

SITTAMPALAM, S. et al. Three-Dimensional Cell Culture Assays: Are They More Predictive of In Vivo Efficacy than 2D Monolayer Cell-Based Assays? **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 13, n. 5, p. 254–261, 2015.

SORG, R. et al. Minimizing hydrodynamic stress in mammalian cell culture through the lobed Taylor-Couette bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 12, p. 1504–1515, 2011.

STADLER, M. et al. Increased complexity in carcinomas: Analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, n. 1, p. 107–124, 2015.

TONKENS, R. An Overview of the Drug Development Process. **The Physician Executive**, v. 31, n. 3, p. 48–52, 2005.

TOSTÕES, R. M. et al. Human liver cell spheroids in extended perfusion bioreactor culture for repeated-dose drug testing. **Hepatology**, v. 55, n. 4, p. 1227–1236, 2012.

TSUI, K.-H. et al. Growth differentiation factor-15: a p53- and demethylation-upregulating gene represses cell proliferation, invasion, and tumorigenesis in bladder carcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12870, 2015.

VALLO, S. et al. Drug-resistant urothelial cancer cell lines display diverse sensitivity profiles to potential second-line therapeutics. **Translational Oncology**, v. 8, n. 3, p. 210–216, 2015.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.

YORITA, K. et al. A subserosal, pedunculated, multilocular uterine leiomyoma with ovarian tumor-like morphology and histological architecture of adenomatoid tumors: A case report and review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**, v. 10, n. 1, 2016.

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.

ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**,

v. 6, p. 1–11, 2016.

ZHU, X. H. et al. Study of cell seeding on porous poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) sponge and growth in a Couette-Taylor bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 6, p. 2108–2117, 2010.

APÊNDICE

Tabela de Resultados

Tabela 16. Resultados obtidos do cultivo estático de RT4 em meio McCoy 5A realizado em duplicata.

Tempo (h)	Número de células	DP	C de Glicose (mM)	DP	Controle Glicose* (mM)	C de Glutamina (mM)	DP	Controle Glutamina* (mM)
0	69360		16,86		16,86	0,86		0,86
23	65250	12990	15,78	0,37	16,96	0,73	0,00	0,95
47	149625	26562	15,47	0,07	17,37	0,62	0,04	0,88
72	278625	45122	13,87	0,44	17,48	0,40	0,03	0,74
95,5	506625	44317	13,54	0,00	18,19	0,22	0,02	0,65
119	721500	89372	12,00	0,15	18,61	0,12	0,05	0,66
144,5	795375	67985	9,82	0,01	19,02	0,01	0,01	0,56
168	671625	150535	8,06	0,18	19,33	0,00	0,00	0,63

* Valores obtidos em um poço sem células. DP = desvio padrão. C = concentração de.

Tabela 17. Resultados obtidos do cultivo estático de RT4 em meio McCoy 5A realizado em duplicata.

Tempo (h)	Velocidade específica de crescimento (μ) (h^{-1})	Consumo específico de glicose (q_{Gli}) (mmol/célula·hora)	Consumo específico de glutamina (q_{Gln}) (mmol/célula·hora)
0	-0,003	$5,15 \times 10^{-10}$	$9,40 \times 10^{-11}$
23	0,026	$4,24 \times 10^{-10}$	$5,87 \times 10^{-11}$
47	0,029	$2,19 \times 10^{-10}$	$1,03 \times 10^{-11}$
72	0,027	$1,26 \times 10^{-10}$	$7,74 \times 10^{-12}$
95,5	0,019	$7,35 \times 10^{-11}$	$4,94 \times 10^{-12}$
119	0,008	$7,58 \times 10^{-11}$	$1,92 \times 10^{-12}$
144,5	-0,001	$6,88 \times 10^{-11}$	$1,09 \times 10^{-12}$
168	-0,008	$7,44 \times 10^{-11}$	$2,36 \times 10^{-12}$

Tabela 18. Concentrações dos dois principais nutrientes e principal metabólito nos 11 casos do DCCR.

	Tempo (h)	0 0	0 1,41	0 -1,41	1 1	1 -1	-1 1	-1 -1	1,41 0	-1,41 0
Glicose (mM)	0	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7
	24	14,3	12,0	15,9	12,6	15,2	11,4	15,3	13,6	14,5
	48	11,8	8,0	15,3	11,4	14,8	9,0	14,0	10,5	13,3
	72	10,1	6,2	14,5	8,8	13,2	7,4	13,2	8,7	12,0
	96	9,1	5,5	14,3	7,4	11,4	6,6	12,5	7,2	11,3
	120	7,9	4,6	14,4	6,1	10,7	6,4	12,3	6,4	11,3
	144	7,4	4,6	13,9	5,0	10,0	6,5	12,1	5,5	10,7
	168	6,8	4,1	14,0	4,0	8,8	6,6	12,0	5,3	10,8
Lactato (mM)	0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	24	3,7	5,0	2,2	3,9	2,4	7,3	3,8	4,3	3,6
	48	6,9	9,9	3,0	5,3	3,6	11,0	5,3	7,3	6,0
	72	8,4	11,9	3,6	5,7	5,4	12,1	6,6	9,3	7,3
	96	10,0	12,0	4,2	5,9	6,6	12,7	7,4	10,2	7,9
	120	11,4	11,0	4,8	6,0	8,0	12,4	8,0	10,8	8,6
	144	11,9	11,9	5,2	6,5	9,5	12,9	8,3	11,9	8,6
	168	12,7	12,0	5,4	6,6	10,6	12,4	8,4	12,0	8,7
Glutamina (mM)	0	0,95	0,93	0,93	0,87	0,87	0,97	0,97	0,97	0,87
	48	0,45	0,12	0,75	0,54	0,25	0,29	0,60	0,23	0,61
	120	0,29	0,16	0,59	0,11	0,32	0,27	0,64	0,11	0,50
	168	0,28	0,16	0,57	0,13	0,22	0,30	0,59	0,09	0,46

ANEXO**ARTIGO PRODUZIDO DURANTE O DOUTORADO COMO AUTOR PRINCIPAL**

(SANTOS et al., 2018) ASSESSING THE POTENCIAL OF A TAYLOR VORTEX BIOREACTOR FOR THE PRODUCTION OF SIZE-CONTROLLED TUMOR SPHEROIDS: A CASE STUDY WITH HUMAN BLADDER CANCER CELLS.

Estado atual: Em preparação para submissão ao periódico

Periódico: **Journal of Biotechnology** (Qualis A1 – Engenharias II)

ARTIGO PRODUZIDO DURANTE O DOUTORADO COMO SEGUNDO AUTOR

(DECARLI et al., 2018) DROSOPHILA S2 CELL CULTURE IN A WAVE BIOREACTOR: POTENTIAL FOR SCALING UP THE PRODUCTION OF THE RECOMBINANT RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN

Estado atual: Versão aceita e recomendada para publicação mediante a apreciação das revisões sugeridas (Texto aceito em anexo)

Periódico: **Applied Microbiology and Biotechnology** (Qualis A1 – Engenharias II)