

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

LISETH VIVIANA GONZÁLEZ GIL

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO BIORREATOR DE VÓRTICES DE TAYLOR
NA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

SÃO CARLOS
2019

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

LISETH VIVIANA GONZÁLEZ GIL

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO BIORREATOR DE VÓRTICES DE TAYLOR
NA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Claudio A.

SÃO CARLOS
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Liseth Viviana Gonzalez Gil, realizada em 29/04/2019:

Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo
UFSCar

Prof. Dr. Aldo Tonso
USP

Profa. Dra. Angela Maria Moraes
UNICAMP

Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri
UNESP

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciadori
UFSCar

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Aldo Tonso, Angela Maria Moraes e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

“Nada na vida é para ser temido, apenas sim para ser entendido.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor Dr. Claudio Suazo,

Pela oportunidade e por confiar em meu trabalho, por me apoiar e aconselhar quando eu precisava, por me ensinar e transferir o carinho que o senhor tem por esta área de pesquisa. Muito obrigada professor.

A mis padres y hermanos,

por acompañarme, aconsejarme, apoyarme y escucharme en todas las experiencias que he vivido. Es un hecho que sin alguno de ustedes esta travesía no sería igual. Todo mi amor para ustedes.

A mi querido Chilvis,

Gracias César por todos los momentos compartidos, por el apoyo, las risas y la compañía y por hacer parte de esta historia. Tu apoyo y cariño han sido mi alegría. Te quiero mucho.

A mis amigos,

Saidy y Hernan por la paciencia, cariño, las palabras de aliento y las aventuras, que han sido muchas veces una fortaleza. Los quiero mucho.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP, por viabilizarem esse estudo.

Edilson da oficina do departamento de Química, pelas ideias e a ajuda na construção do Taylor. Agradeço também pelas conversas e conselhos.

À professora Kamilla Swiech e ao laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto: Patrícia e Camila pelas análises de citometria de fluxo realizadas.

Ao prof. Dr Odilio e a Jessica Campos pela ajuda com as imagens do MEV.

A Harminder pela ajuda com os cálculos computacionais.

A meus amigos Margarita, el negro y Viviana por su compañía, consejos y sus risas.

Aos amigos de laboratório: Monize, Juliana, Diogo, Pedro, Eric pela ajuda, ideias e conselhos em todos esses anos de convivência.

E a todos aqueles que, embora não nomeados, fizeram parte desta etapa da minha vida, muito obrigada a todos!

RESUMO

O interesse no uso das células estromais mesenquimais (CEMs) tem aumentado nos últimos 10 anos como consequência do crescente descobrimento de suas características atraentes na regeneração de órgão e tecido, no campo da terapia celular e engenharia de tecidos. Apesar de estar presente na maioria dos órgãos e tecidos pós-natais, a quantidade de CEMs requeridas para iniciar qualquer tratamento clínico é insuficiente e por isso há necessidade de sua expansão *in vitro*. Sistemas de cultivo com o uso de microcarregadores e biorreatores, como o tradicional tanque agitado, são apresentados como a proposta mais imediata, permitindo obter altas densidades celulares em um ambiente 3D mais parecido com o *in vivo*. Apesar do tanque agitado ser o mais utilizado em vários bioprocessos, em cultivo de células aderentes tem apresentado algumas limitações relacionadas com a distribuição heterogênea de forças hidrodinâmicas dentro do biorreator e a dificuldade para controlar o tamanho de agregados formados durante o cultivo, afetando finalmente o rendimento do processo de obtenção de células viáveis e funcionais necessárias nos tratamentos clínicos. Uma proposta bastante promissora de biorreator por apresentar baixas e mais homogêneas tensões de cisalhamento, transferência de oxigênio satisfatória e facilidade no escalonamento é o Biorreator de Escoamento em Vórtices de Taylor (BEVT). Em um estudo preliminar, o BEVT, com um volume de trabalho de 60 mL, se mostrou promissório no cultivo de uma linhagem de CEMs imortalizadas aderidas a microcarregadores, apresentando tamanhos controlados de agregados celulares (<400 μm) em condições de baixas tensões de cisalhamento e com suficiente transferência de oxigênio. Nesse sentido, o presente trabalho envolveu a construção e o estudo de um BEVT com um volume de trabalho de 100 mL, para o cultivo de CEMs primárias usadas atualmente nos tratamentos clínicos. Desse modo, a avaliação adicional de parâmetros hidrodinâmicos importantes como a velocidade mínima de suspensão de partículas (N_{s1}) e tempo de mistura (θ_m) em diferentes condições de rotação, foram abordados para duas configurações de cilindro interno, nomeados neste estudo como redondo e deformado. Nesta avaliação o BEVT com o cilindro interno deformado apresentou melhor performance e foi o escolhido nos estudos de cultivo. Para esta configuração foram obtidos valores de N_{s1} entre 70 e 90 rpm, usando uma concentração de 1 a 3 g de microcarregadores/mL, e um θ_m máximo de $21 \pm 2,2$ segundos para uma velocidade de rotação de 50 rpm. Os cultivos de expansão de CEMs derivadas de cordão umbilical e tecido adiposo em 1 e 3 g/L de Cultispher[®]S, usando o meio de cultivo alfa MEM com 10 % SFB, confirmaram a melhor modulação da agregação apresentada no BEVT, em comparação com o frasco *Spinner*, em condições de baixo cisalhamento, confirmadas através da atividade da enzima LDH, e com transferência de oxigênio adequada, obtendo fatores de expansão de até 17 vezes de CEMs viáveis e funcionais. Desta forma, estes resultados apresentam o BEVT como uma alternativa bastante promissória para o cultivo de CEMs em larga escala para a terapia celular.

Palavras chave: Células estromais mesenquimais (CEMs) humanas. Biorreator de Escoamento em Vórtices de Taylor (BEVT). Agregados em sistemas de cultivo agitado baseado em microcarregadores. Critério de suspensão (N_{s1}). Tempos de mistura (θ_m).

ABSTRACT

Interest in the use of mesenchymal stromal cells (MSCs) has increased in the last 10 years because of the increasing discovery of its special characteristics for the treatment of diseases through cell therapy or tissue engineering. Despite being in the majority of postnatal organs and tissues, the amount of MSCs required to initiate any clinical treatment is insufficient and therefore the necessity of its in vitro expansion. Cultivation systems with the use of microcarriers and bioreactors, such as the stirred tank, are presented as the immediate proposal, allowing to obtain high cellular densities in a 3D environment. However, the stirred tank presents some limitations related to the distribution of hydrodynamic forces within the bioreactor and the difficulty in controlling the size of aggregates formed during cultivation, ultimately affecting the process yield of obtaining viable cells. A highly promising bioreactor proposal for presenting low and more homogeneous shear stresses, satisfactory mass transfer and ease of scaling is the Taylor Vortex Flow Bioreactor (TVFB). In a preliminary study, the BEVT, with a work volume of 60 mL, was promising in the cultivation of a line of immortalized CEMs attached to microcarriers, presenting controlled sizes of cellular aggregates (<400 μm) under conditions of low shear stresses and with sufficient oxygen transfer. In this sense, the present work involved the construction and the study of a BEVT with a work volume of 100 mL, for the cultivation of primary CEMs currently used in clinical treatments. Thus, the additional evaluation of important hydrodynamic parameters, such as the minimum velocity of suspension of particles (N_{s1}) and time of mixing (θ_m) in different conditions of rotation, were approached for two internal cylinder configurations, named in this study as round and deformed. In this evaluation the BEVT with the deformed inner cylinder presented better performance and was chosen in the culture studies. For this configuration N_{s1} values between 70 and 90 rpm were obtained using a concentration of 1 to 3 g of microcarregages/mL and a maximum θ_m of $21 \pm 2,2$ seconds for a rotation speed of 50 rpm. Cultivation of umbilical cord derived CEMs cultures and Cultispher®S 1 and 3 g / L adipose tissue using the 10% SFB alpha MEM culture medium confirmed the best modulation of the aggregation presented in the BEVT, compared to the Spinner flask, under low shear conditions, confirmed by the LDH enzyme activity, and with adequate oxygen transfer, obtaining factors of expansion of up to 17 times of viable and functional CEMs. Thus, these results present the BEVT as a very promising alternative for the cultivation of large-scale CEMs for cell therapy.

Keywords: Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs). Taylor Vortex Flow Bioreactor (TVFB). Aggregation of MSC in microcarrier-based culture system. Minimum speed of suspension (N_{s1}). Mixing time (θ_m).

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Tendência do número de tratamentos clínicos registados de CEMs baseados em terapia celular desde 2001 a 2015. Dados coletados de www.clinicaltrials.gov | 6 |
| Figura 2. (A) Registro de tratamentos clínicos de CEMs classificados por fase clínica; (B) CEMs de diferentes fontes aplicadas em tratamentos clínicos atualmente. Dados coletados de www.clinicaltrials.gov | 10 |
| Figura 3. Representação esquemática dos biorreatores utilizados para cultivo de CEMs. | 18 |
| Figura 4. Esquema do STVL e o HARV, desenho da esquerda e direita, respetivamente..... | 20 |
| Figura 5. Desenho esquemático do escoamento de líquido entre dois cilindros concêntricos, com o externo fixo e o interno rotatório: a) regime laminar-Couette, b) regime de fluxo em vórtices de Taylor (FVT), c) regime de fluxo wavy (FVW) e d) regime de fluxo turbulento..... | 23 |
| Figura 6. Esquema de biorreatores Taylor-Couette usados no estudo de Tanzeglock, (2008)..... | 25 |
| Figura 7. Representação do modelo de crescimento em cultivo dinâmico de células aderentes e fatores influenciadores. | 28 |
| Figura 8. Agregados de microcarregadores Cultispher® S após 192 horas de cultivo de células primárias no Biorreator de Escoamento em Vórtices de Taylor (BEVT) a 100 rpm e em meio alfa MEM suplementado com 10% de SFB. | 29 |
| Figura 9. Típico perfil de concentração do traçador depois da adição no tanque agitado para determinação de θ_m | 39 |
| Figura 10. Ilustração do frasco <i>Spinner</i> e dimensões do impelidor. | 46 |
| Figura 11. Desenho do BEVT e seus componentes principais..... | 47 |
| Figura 12. Protótipo do BEVT utilizado nos experimentos de cultivo de CEMs, com o agitador (cilindro interno) e membrana de silicone. a) Base, b) parte superior, c) visão lateral do cilindro interno e d) a tampa superior unida ao cilindro interno através da haste de vidro..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Configurações do BEVT usadas com: (A) cilindro interno deformado; (B) Altura do líquido com o cilindro interno deformado; (C) Altura do cilindro interno redondo. | 50 |
| Figura 14. Esquema dos BEVT com o cilindro interno redondo (esquerda) e o deformado em forma de prisma reto de base quadrada (direita) usados neste trabalho, dimensões dadas em cm..... | 50 |
| Figura 15. Modificação realizada no BEVT. Em (A) o cilindro interno recoberto com um filme plástico (poliéster) até o fundo do biorreator para determinação do N_{s1} . Modificação final do BEVT para os processos posteriores (B), com peça de PTFE encaixada na parte inferior do cilindro interno (C) e (D). Vista completa do cilindro interno com membrana e a nova peça de PTFE (E). Base do frasco de vidro com camada de silicone e filme de PTFE (F). | 51 |
| Figura 16. Esquema de obtenção de dados através dos sensores de temperatura tipo K, para determinação do tempo de mistura a frequências de rotação entre 50 e 120 rpm no BEVT..... | 54 |
| Figura 17. Procedimento seguido na realização de um experimento de cultivo no BEVT. As etapas são: 1) Descongelamento e ativação celular; 2) Cultivo em 2D para preparação do inóculo no BEVT; 3) Expansão em 3D no BEVT e 4) Recuperação e diferenciação celular depois do cultivo..... | 59 |
| Figura 18. Ilustração da sedimentação observada no fundo do BEVT com cilindro interno redondo, apresentada para uma concentração de 2 g/L Cultispher®S em PBS, com velocidades entre 115 a 210 rpm. A região escura indicada pela seta vermelha evidencia a deposição de microcarregadores e sua tendência a diminuir com o aumento da agitação. | 73 |
| Figura 19. Avaliação do N_{s1} por inspeção visual usando o BEVT com o cilindro interno redondo para 1 g/L de Cultispher®S tingidos com violeta cristal. As velocidades de rotação do cilindro interno nestas imagens foram de 70 (A), 80 (B) e 90 (C) rpm. | 75 |
| Figura 20. Resultados de verificação do tempo necessário para atingir massa seca constante na determinação do N_{s1} no BEVT através de medidas de massa seca de microcarregadores, n=3. | 75 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. Resultados das medidas de N_{s1} para o BEVT com o cilindro interno deformado (A) e o BEVT com o cilindro interno normal (B), com concentrações entre 1 a 4 e 1 a 5 g/L, respectivamente, usando microcarregadores Cultispher®S, determinados por retirada de amostras na parte superior e inferior do frasco a diferentes frequências de rotação com $n=3$ | 76 |
| Figura 22. Comparação dos resultados de N_{s1} para diferentes cargas de microcarregadores, frequência de rotação e tipos de impelidor: 1) 6 Turbinas; 2) InterMIG; 3) Pulga e pás verticais; 4) Pulga horizontal; 5) 3-pás inclinadas à 45°; 6) Pás; 7) Lâmina de 3 segmentos; 8) Pás e barra; 9) Orelha de elefante; 10) Turbina Marine e 11) Turbina Rushton de 4 pás, encontrados na literatura e os obtidos com o BEVT com o cilindro interno deformado (círculos vazios pretos). | 78 |
| Figura 23. Relação do diâmetro médio dos turbilhões de Kolmogorov (η) e o número de Reynolds para o BEVT com cilíndrico interno redondo (A) e cilindro interno deformado (B). Os cálculos foram realizados usando as equações do item 4.7.4 e a Equação 4. A linha pontilhada vermelha indica a condição limite de velocidade de rotação. | 79 |
| Figura 24. Perfil de resposta dos sensores para determinação do tempo de resposta. O S1 é o sensor superior, colocado aproximadamente a 7 cm da superfície, e o S2 é o sensor inferior, localizado a 0,5 cm da base, os dois colocados dentro do BEVT. | 81 |
| Figura 25. Perfil de dados coletados pelo método térmico através da injeção do traçador de calor com volumes de 1, 2, 3 e 5 % para a verificação da influência no θ_m , com S1 indicando a posição do sensor superior, próximo à superfície do líquido, e S2 o sensor inferior, localizado próximo da base do BEVT..... | 82 |
| Figura 26. Perfil de dados coletados pelo método térmico para a obtenção do θ_m do BEVT normal a 100 rpm. Medições realizadas com um sensor de temperatura localizado na parte superior (S1), a 0,5 cm da superfície, e um inferior (S2), a 0,5 cm da base, com volume de injeção de água quente (80 °C) de 3 mL em 97 mL de água a temperatura entre 19-23°C encontrados dentro do BEVT. | 83 |

| | |
|--|----|
| Figura 27. Resultados de revoluções $N\theta_m$ para o BEVT com o cilindro interno redondo (círculos) e cilindro interno deformado (quadrados) pelo método colorimétrico (visual) e através do método térmico. | 85 |
| Figura 28. Resultados experimentais do tempo de mistura (θ_m), encontrados através do método térmico, em função do número de Reynolds para o BEVT com o cilindro interno redondo (A) e com o cilindro interno deformado (B). As correlações foram obtidas para tanque agitado com chicanas. | 86 |
| Figura 29. Visualização dos vórtices no BEVT com o cilindro interno deformado pelo método colorimétrico a 500 rpm, usando glicerina pura misturada com $0,004 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de vermelho de fenol e a adição de 10 M de NaOH..... | 86 |
| Figura 30. Visualização dos vórtices no BEVT com o cilindro interno redondo pelo método colorimétrico a 70 rpm, usando água com $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenolftaleína e a adição de 10 M de NaOH. | 87 |
| Figura 31. Regime de fluxo ocorrendo a velocidades de rotação de 50 e 120 rpm em três configurações de cilindro interno no BEVT, visualizadas através do uso de um fluido reoscópico. Imagens obtidas com (A) cilindro interno redondo, (B) cilindro interno deformado e (C) cilindro interno quadrado. | 89 |
| Figura 32. Resultados do experimento EEP1 realizado no BEVT1 a 50 rpm usando meio MesenPRO (Gibco) com 2% de SFB, para cultivo da linhagem hMSC-TERT com inoculo de $7,5 \times 10^6$ células em 3 g/L de microcarregador MAG. Em A) pH; B) concentração de glicose e lactato; C) diâmetro médio de agregados e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, $n=3$ | 93 |
| Figura 33. Resultados do experimento EEP2 realizado no BEVT1 a 70 rpm, usando meio alfa MEM com 15% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inoculo de $1,25 \times 10^5$ células/mL em 3 g/L de microcarregador MAG. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e número de células | |

| | |
|---|-----|
| livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=3. | 94 |
| Figura 34. Variação da atividade da enzima LDH proveniente de 15 % de SFB em meio alfa MEM durante incubação a 37 °C (A), e variabilidade da absorbância em diferentes condições de pH da enzima proveniente de meio alfa MEM com 10 % de SFB, n=30 (B). | 97 |
| Figura 35. Resultados do experimento EBT1 realizados no BEVT2 a 100 rpm, usando alfa MEM com 10 % de SFB, para cultivo de CEMs-CU com inóculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL e 1 g/L de microcarregador Cultispher®S. A) pH; B) concentração de glicose, glutamina, arginina e lactato; C) diâmetro médio de agregados e D) o número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT e método enzimático usando TrypLE®Select (1X), e o número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão com tripan, n=3. | 98 |
| Figura 36. Resultados de determinação de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EBT1 realizado com CEMs-CU em triplicata no BEVT2 a 100 rpm. As quedas nos valores de absorbância são produto das trocas de meio de 50 % realizadas as 96 e 144 h. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, n=3. | 99 |
| Figura 37. Recuperação e viabilidade das CEMs-CU aderidas aos microcarregadores usando as enzimas colagenase tipo I e TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no BEVT2 a 100 rpm. | 100 |
| Figura 38. Resultados do experimento EFS1 realizado no frasco <i>Spinner</i> a 30 rpm, usando meio alfa MEM com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inóculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 1 g/L de microcarregador Cultipher®S. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=3. Trocas de meio de 25 e 50 % foram realizadas as 96 e 144 h, respectivamente. | 101 |

| | |
|---|-----|
| Figura 39. Imagem dos agregados de microcarregadores-células apresentados às 268 h de cultivo no frasco <i>Spinner</i> a 30 rpm com CEMs-CU aderidas a microcarregador Cultispher®S. | 102 |
| Figura 40. Resultados da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EFS1 realizado com CEMs-CU em triplicata no frasco <i>Spinner</i> a 30 rpm. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, n=3. | 102 |
| Figura 41. Recuperação e porcentagem de viabilidade das CEMs-CU aderidas aos microcarregadores usando a enzima TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no <i>Spinner</i> a 30 rpm. | 102 |
| Figura 42. Resultados em porcentagem dos marcadores de superfície por citometria de fluxo das CEMs-CU recuperadas dos experimentos do grupo PC1, realizados a 100 e 30 rpm no BEVT2 e no frasco <i>Spinner</i> , respectivamente. | 103 |
| Figura 43. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU antes do cultivo em biorreator. | 104 |
| Figura 44. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU recuperadas de dois experimentos realizados com CEMs de cordão umbilical a 100 rpm no BEVT2 (EBT1). | 105 |
| Figura 45. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU recuperadas dos experimentos realizados com CEMs de cordão umbilical a 30 rpm no <i>Spinner</i> (EFS1). | 106 |
| Figura 46. Resultados do experimento EBT2 realizado no BEVT1 a 90 rpm, usando meio alfa MEM com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inoculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 3 g/L de microcarregador Cultispher®S. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=8. | 107 |

| | |
|---|-----|
| Figura 47. Recuperação (eixo esquerdo) e viabilidade (eixo direito) das CEMs-CU recuperadas pelo processo de digestão enzimática usando a TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no BEVT realizado a 90 rpm. | 108 |
| Figura 48. Resultados de determinação de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EBT2 realizado com CEMs-CU em triplicata no BEVT2 a 90 rpm. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, n=3. | 109 |
| Figura 49. Frequência de agregados com tamanhos menores a 0,3 mm durante o experimento EBT2 realizado com CEMs-CU em triplicata no BEVT2 a 90 rpm, n=100. | 109 |
| Figura 50. Imagens de MEV coletadas durante os experimentos realizados no BEVT2 a 90 rpm com CEMs-CU aderidas a microcarregador Cultispher®S. As imagens foram coletadas durante as 0, 96, 168 e 216 horas. A primeira imagem apresenta microcarregadores Cultispher®S antes do experimento. Magnificação de 100x. | 110 |
| Figura 51. Resultados do experimento EBT2 realizado no BEVT2 a 90 rpm, usando meio alfa MEM com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-TA com inoculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 3 g/L de microcarregador Cultispher®S. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=8. | 111 |
| Figura 52. Recuperação e porcentagem de viabilidade das CEMs-AT aderidas aos microcarregadores usando a enzima TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no BEVT realizado a 90 rpm. | 112 |
| Figura 53. Resultados de determinação de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EBT2 realizado com CEMs-TA em triplicata no BEVT2 a 90 rpm. A linha vermelha indica | |

| | |
|--|-----|
| o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, n=3. | 112 |
| Figura 54. Frequência de agregados com tamanhos menores a 0,3 mm, durante o experimento realizado com CEMs-TA, em triplicata no BEVT2 a 90 rpm, n=100. | 113 |
| Figura 55. Imagens de MEV coletadas durante os experimentos realizados no BEVT2 a 90 rpm com CEMs-TA aderidas a microcarregador Cultispher®S. As imagens foram coletadas durante as 0, 96, 168 e 264 h. A imagem superior esquerda apresenta microcarregadores Cultispher®S antes do experimento. Magnificação de 100x. | 113 |
| Figura 56. Resultados em porcentagem dos marcadores de superfície por citometria de fluxo das CEMs-CU e TA recuperadas dos experimentos do grupo PC2 realizados no BEVT2..... | 114 |
| Figura 57. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU recuperadas dos experimentos realizados com CEMs de tecido adiposo a 90 rpm no BEVT2 (EBT1). | 115 |
| Figura 58. Resultados da diferenciação celular das CEMs-TA recuperadas dos experimentos realizados com CEMs de cordão umbilical a 90 rpm no BEVT2 (EBT2)..... | 116 |
| Figura 59. Resultados do experimento de cultivo realizado no frasco <i>Spinner</i> a 30 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inóculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 3 g/L de microcarregador Cultispher® S. A) pH; B) concentração de glicose e lactato; C) diâmetro médio de agregados e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e o número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=8..... | 117 |
| Figura 60. Resultados da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicador de lise celular no experimento PC2 realizado com CEMs-CU no frasco <i>Spinner</i> de 100 mL a 30 rpm. A linha vermelha indica o valor da média da atividade | |

| | |
|---|-----|
| da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula. | 118 |
| Figura 61. Formação e deposição de agregados de microcarregadores colonizados com CEMs durante o cultivo em frasco <i>Spinner</i> de 100 mL a 30 rpm de CEMs-CU a partir das 268 h de cultivo. As setas pretas mostram a formação de agregados grandes, alguns deles depositados nas pás do impelidor como apresentado pela elipse vermelha. | 118 |
| Figura 62. Resultados de recuperação celular obtidos com o uso da enzima dissociativa TrypLE®Select (1X) do experimento realizado com CEMs-CU em frasco <i>Spinner</i> de 100 mL a 30 rpm. | 119 |
| Figura 63. Imagens do cultivo no BEVT1 e BEVT2 das CEMs aderidas aos microcarregadores nos experimentos de cultivo. EP1 às 8 h, 48 h, 120 h, 168 h, 216 h, EP 2 às 8 h, 48 h, 120 h, 168 h, 192-240 h, PC1 e PC2 (BEVT1,2) às 8 h, 48 h, 120 h, 168 h, 216-264 h e PC2 (<i>Spinner</i>) 24, 244, 312, 360, 384 e 406 h. | 123 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Tipo de célula, doença e dose estimada necessária por paciente. | 11 |
| Tabela 2. Características de escoamento de líquido entre dois cilindros concêntricos, com o externo fixo e o interno rotatório, com valores da relação de raios (η) diferentes..... | 24 |
| Tabela 3. Trabalhos encontrados na literatura realizados com cultivo de células animais no BEVT..... | 27 |
| Tabela 4. Quantidades típicas usadas de diferentes microcarregadores em experimentos de cultivo com células aderentes. | 33 |
| Tabela 5. Classificação de técnicas para a determinação do tempo de mistura (θ_m) em tanque agitado..... | 35 |
| Tabela 6. Vantagens e desvantagens de métodos para medição do tempo de mistura (θ_m) em tanque agitado..... | 36 |
| Tabela 7. Vantagens e desvantagens do método colorimétrico para determinação de θ_m | 38 |
| Tabela 8. Características do microcarregador Cultispher®S (PerCell Biolytica, Suécia) e MAG usados nos cultivos para aderência das CEMs..... | 44 |
| Tabela 9. Composição do meio de cultura α -MEM utilizado nos cultivos das CEMs. | 45 |
| Tabela 10. Dimensões e características geométricas dos BEVT utilizados neste trabalho. | 49 |
| Tabela 11. Composição da solução de PBS usada durante os experimentos. | 52 |
| Tabela 12. Informações específicas sobre as metodologias utilizadas nos testes de diferenciação celular das CEMs. | 64 |
| Tabela 13. Programação e descrição dos experimentos | 68 |
| Tabela 14. Quantidade de microcarregadores Cultispher®S utilizadas para determinação de N_{s1} no BEVT. | 73 |
| Tabela 15. Resultados da determinação da N_{s1} no BEVT com PBS a diferentes concentrações de microcarregador Cultispher®S determinados por inspeção visual. | 74 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 16. Medidas de N_{s1} realizadas com microcarregadores empregados em cultivo de células animais dependentes de ancoramento em diferentes concentrações e com vários tipos de impelidores em biorreator tipo tanque agitado. | 77 |
| Tabela 17. Resultados do θ_{99} no BEVT com o cilindro interno redondo pelo método colorimétrico (visual) e através do método térmico em triplicata, $n=3$ | 84 |
| Tabela 18. Resultados do θ_{99} no BEVT com o cilindro interno deformado pelo método colorimétrico (visual) e através do método térmico, $n=3$ | 84 |
| Tabela 19. Levantamento de dados tempos de mistura (θ_m), usando diferentes técnicas, para vários tipos de impelidores encontrados na literatura. | 88 |
| Tabela 20. Resumo das características hidrodinâmicas do BEVT e do biorreator de tanque agitado (frasco <i>Spinner</i>) analisados neste trabalho. | 90 |
| Tabela 21. Comparação de algumas características físicas a serem consideradas no escalonamento do BEVT e do biorreator de tanque agitado tradicional. | 91 |
| Tabela 22. Dados de absorbância de LDH obtidos do meio de cultivo alfa MEM a 5, 10 e 15% de SFB. As medições foram feitas em condições normais de cultivo, 37°C e 5% de CO ₂ , em frasco agitado. | 96 |
| Tabela 23. Resumo das condições utilizadas e dos resultados obtidos nos experimentos de cultivo de CEMs no BEVT1, BEVT2 e no frasco <i>Spinner</i> | 122 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCs: Células Estromais Mesequimais derivadas de tecido adiposo

BEVT: Biorreator de Escoamento em vórtices de Taylor

BPR: Biorreator de parede rotativa

CEMs: Células Estromais Mesequimais

CHO: Ovário de hamster chinês

CTEs: Células-Tronco Embrionárias

CTPIs: Células Tronco Pluripotentes Induzidas

DMSO: Dimetilsulfóxido

FE: Fator de expansão

FVT: Fluxo com vórtices de Taylor

FVW: Fluxo com vórtices Wavy

GFP: Proteína de fluorescência verde

HARV: Frasco de alta relação de aspecto

hMSC-TERT: Célula Estromal Mesenquimal imortalizada pela proteína catalítica TERT

LDH: Enzima Lactato Deshidrogenase

L929: Células de fibroblasto de rato

MC: Microcarregador

MEC: Matriz Extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

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

NASA: Agência Espacial e de Aeronáutica Nacional Americana

PBS: Solução tampão fosfato

PFTE: Politetrafluoretileno (nome comum teflon)

RPM: Rotações por minuto

SCCR: Sistemas de Cultivo Celular Rotativos

SFB: Soro Fetal Bovino

STLV: Frasco de giro lateral lento

LISTA DE SÍMBOLOS

D: Diâmetro impelidor (m)

d_p : Tamanho da partícula (m)

d : Espaço anular (m)

$d_{\text{microcarregador}}$: Diâmetro de microcarregador (μm)

ϵ : Energia de dissipação (W/m^3)

G: Número de Torque (Adimensional)

H: Altura do líquido (m)

k_{La} : Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

μ : Viscosidade ($\text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$)

μ_{max} : Velocidade de crescimento específica (h^{-1})

N: Frequência de rotação (s^{-1})

N_{θ_m} : Número de rotações do impelidor (Adimensional) N_{s1} : Velocidade mínima de suspensão (rpm)

η : Escala de turbilhões de Kolmogorov (μm)

θ_m : Tempo de mistura (s)

σ : Razão entre os raios (Adimensional)

P: Potência (W)

Re: Número de Reynolds

R_{int} : Raio interno (m)

R_{ext} : Raio externo (m)

S: Constante da correlação do N_{s1} (Adimensional)

$\Delta\rho$: Diferença de densidades da partícula e do líquido (kg/m^3)

ρ_L : Densidade do líquido (kg/m^3)

θ_m : Tempo de mistura (s)

τ : Tensão de cisalhamento (N/m^2)

Γ : Razão de aspecto (Adimensional)

T: Diâmetro tanque (m)

ν : Viscosidade cinemática (m^2/s)

V: Volume (m^3)

X: Porcentagem de peso das partículas ($\text{g/g} \cdot 100$)

$Y_{\text{lac/gli}}$: Rendimento aparente do lactato a partir da glicose (Adimensional)

$\dot{\gamma}$: Taxa de cisalhamento (s^{-1})

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1 PROMESSA DO USO DE CEMs..... | 5 |
| 2.2 CÉLULAS TRONCO (CTs)..... | 6 |
| 2.2.1 Células-tronco embrionárias | 7 |
| 2.2.2 Celulas Estromais Mesenquimais (CEMs) adultas | 7 |
| 2.3 CULTIVO DE CEMs ADULTAS EM LARGA ESCALA..... | 12 |
| 2.3.1 Biorreatores para expansão de células aderentes | 13 |
| 2.3.2 Biorreatores de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT) | 21 |
| 2.3.3 Agregação em cultivo de CEMs dependentes de ancoramento | 27 |
| 2.4 VELOCIDADE MÍNIMA DE SUSPENSÃO (N_{s1})..... | 30 |
| 2.5 TEMPO DE MISTURA (θ_m)..... | 34 |
| 2.6 COMENTÁRIOS FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 40 |
| 3 OBJETIVOS | 42 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 CÉLULAS..... | 43 |
| 4.2 MICROCARREGADORES..... | 43 |
| 4.3 MEIOS DE CULTURA E CONGELAMENTO..... | 44 |
| 4.4 PREPARO DE INÓCULO..... | 46 |
| 4.5 FRASCO <i>SPINNER</i> | 46 |
| 4.6 BIORREATOR DE ESCOAMENTO EM VÓRTICES DE TAYLOR (BEVT)..... | 46 |
| 4.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HIDRODINÂMICOS NO BEVT..... | 52 |
| 4.7.1 Medição da velocidade mínima de suspensão (N_{s1}) no BEVT | 52 |
| 4.7.2 Medição do tempo de mistura (θ_m) no BEVT | 53 |
| 4.7.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) 55 | |
| 4.7.4 Cálculo da tensão de cisalhamento no BEVT | 55 |
| 4.8 PROCEDIMENTO PADRÃO SEGUIDO NOS EXPERIMENTOS DE CULTIVO DAS CEMs NO BEVT E NO FRASCO <i>SPINNER</i> | 57 |
| 4.8.1 Ativação das células | 57 |
| 4.8.2 Preparação para inoculação no BEVT e frasco <i>Spinner</i> | 57 |
| 4.8.3 Cultivo no BEVT | 58 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.8.4 | Cultivos em frasco <i>Spinner</i> | 60 |
| 4.9 | MÉTODOS ANALÍTICOS | 60 |
| 4.9.1 | Análise de viabilidade e densidade celular | 60 |
| 4.9.2 | Quantificação da morte celular | 61 |
| 4.9.3 | Análise de glicose, lactato, aminoácidos e amônia | 61 |
| 4.9.4 | Medição do tamanho de agregados durante o cultivo | 62 |
| 4.9.5 | Fixação de células para microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 62 |
| 4.9.6 | Diferenciação celular | 63 |
| 4.10 | ANÁLISE DE RESULTADOS DE CULTIVO | 65 |
| 4.10.1 | Cálculo da velocidade específica de crescimento e fator de expansão | 65 |
| 4.10.2 | Rendimento aparente do lactato a partir da glicose | 66 |
| 4.10.3 | Histograma de frequência de agregados durante os experimentos | 66 |
| 4.11 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 67 |
| 4.12 | PROGRAMAÇÃO E ESTRATÉGIAS ADOTADAS NOS EXPERIMENTOS | 68 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 72 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO DO N_{s1} NO BEVT | 72 |
| 5.2 | DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE MISTURA (Θ_M) PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO | 80 |
| 5.3 | CULTIVOS NO BEVT E FRASCO SPINNER | 91 |
| 5.3.1 | Resultados dos experimentos preliminares no BEVT1 | 92 |
| 5.3.2 | Experimentos para análise da performance do BEVT2 em cultivos de CEMs primárias | 95 |
| 6. | CONCLUSÕES | 128 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 130 |
| 8. | APÊNDICE A-Código usado para a placa Arduino | 145 |
| 9. | ANEXO A – Tabelas de resultados | 148 |

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 25 anos o interesse no uso de células estromais mesenquimais (CEMs) tem aumentado na terapia clínica devido principalmente às suas características únicas. CEMs são definidas como células não diferenciadas com capacidade de auto-renovação, potencial de diferenciação em vários tipos distintos de células mais especializadas (SENSEBE; BOURIN, 2009) e com a capacidade de ativar mecanismos imunossupressores na modulação de quadros inflamatórios (ENGLISH, 2013). Algumas dessas características foram observadas inicialmente por Thomson em 1998, nas células embrionárias, e posteriormente em células extraídas da medula óssea de um adulto. As células embrionárias apresentadas nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário na fase de blastocisto, contam com a capacidade de dar origem às células das três camadas germinais (THOMSON, 1998). Contudo, o uso dessas células está restringido por questões éticas em vários países, devido à necessidade de destruição do embrião para sua obtenção (MCLAREN, 2001).

Em contrapartida, as CEMs adultas são células encontradas na maioria dos tecidos e órgãos após o desenvolvimento embrionário, caracterizadas por se diferenciarem em células especializadas do mesmo tecido e/ou órgão do qual foram extraídas ou em outros tipos celulares, qualidade denominada de plasticidade celular (GODARA; MCFARLAND; NORDON, 2008; LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005; ZUK et al., 2002). Essas características das CEMs adultas as tornam uma alternativa bastante promissora no tratamento de doenças autoimunes e/ou degenerativas, que os métodos tradicionais da medicina não têm conseguido combater com sucesso. Alguns dos estudos no tratamento de doenças coronárias, pulmonares, infarto do miocárdio e fístulas perianais, entre outros, estão sendo realizados utilizando as CEMs derivadas de várias fontes, e podem ser seguidos no site <https://clinicaltrials.gov/>.

Dentre os estudos mais recentes, está o realizado pelo grupo de García Olmos no Hospital da Paz em Madrid (Espanha), que apresentou resultados

importantes no tratamento da doença de Crohn, uma doença autoimune que vinha apresentando poucos avanços, inclusive através de procedimentos cirúrgicos. Estes resultados, obtidos durante a fase III em estudos clínicos de 49 hospitais em 8 países após testes de toxicidade e eficácia dos procedimentos avaliados nas fases I e II, têm apresentado grande sucesso na aplicação de uma ou várias doses de milhões de células, dependendo da gravidade do paciente, evidenciando a necessidade de grandes quantidades de células para o início e continuação do tratamento (PANÉS et al., 2016).

Apesar das CEMs adultas serem encontradas em diversos órgãos e tecidos, a sua disponibilidade de obtenção é muito baixa, na medula óssea, por exemplo, menor que 0,0001% (CAPLAN, 2007), tornando-se um grande desafio a utilização dessas células nos tratamentos clínicos, já que são necessárias, no mínimo, cerca de 5×10^4 células/dose dependendo da doença (SIMARIA et al., 2014). Em vista da necessidade de grandes quantidades de células, torna-se indispensável o uso de métodos eficientes e otimizados para a expansão destas *in vitro*. Desta forma, e considerando que as CEMs são dependentes de ancoramento, ou seja, que precisam de uma superfície para crescer, as metodologias de expansão *in vitro* convencionais usam placas ou frascos T, permitindo um crescimento em 2D. Por outro lado, estão as tecnologias que empregam microcarregadores, definidos como micropartículas de 100-350 μm de diâmetro manufaturados por materiais com adesividade celular e área superficial incrementada, e biorreatores que favorecem um crescimento em 3D em um ambiente controlado, simulando com grande fidelidade o ambiente *in vivo* (JUNG et al., 2012; MA; TSAI; LIU, 2016; WANG et al., 2005). A utilização de biorreatores junto com microcarregadores para expansão de CEMs em cultivos dinâmicos, vem sendo a solução tecnológica e econômica mais plausível para a disponibilização dessas quantidades de células, visando atender a grande demanda prognosticada de CEMs para aplicações de terapia celular (SIMARIA et al., 2014).

O biorreator mais empregado para cultivo de CEMs aderidas a microcarregadores tem sido o tanque agitado, apesar que este promove a formação excessiva de agregados de microcarregadores colonizados com CEMs, ligados

entre si pela matriz extracelular (MEC), que apresentam zonas necróticas, devido a limitações de acesso à nutrientes, e dificultam o processo final de recuperação das CEMs para posterior uso terapêutico (CARUSO et al., 2014; KAISER et al., 2013). Adicionalmente, o tanque agitado é caracterizado por apresentar tensões de cisalhamento heterogêneas no volume do biorreator, sendo significativamente altas nas regiões próximas do impelidor, podendo danificar as células aderidas aos microcarregadores/agregados mais expostas, e suficientemente baixas nas regiões próximas da parede e superfície do líquido (ISMADI; HOURIGAN; FOURAS, 2014; KAISER et al., 2013).

Neste sentido, novas alternativas de biorreatores e a avaliação da relação entre as características hidrodinâmicas destes, com parâmetros como o critério de suspensão (N_{s1}), transferência de O_2 (k_La), tempo de mistura (θ_m) e tensões de cisalhamento (τ), são indispensáveis para permitir atender melhor às necessidades singulares das CEMs. Dentre estes requerimentos estão: a) forças hidrodinâmicas amenas e homogêneas sem comprometimento da boa mistura, b) capacidade de estimular e modular a agregação celular para conseguir crescimento celular em 3D controlado convenientemente e, c) facilidade de escalonamento do processo de cultivo a volumes tipicamente utilizados em aplicações biomédicas e na produção industrial.

Visando contribuir com essa carência de biorreatores para o cultivo de CEMs, no grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC) do DEQ/UFSCar vem estudando um biorreator que consiste basicamente da exploração das características de escoamento de um líquido colocado entre dois cilindros concêntricos, em que o externo permanece fixo e o interno é rotativo, facilitando a formação de vórtices toroidais. O biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT) preenche plenamente os requisitos listados acima, como foi observado por Santiago, Giordano e Suazo (2011), Nemri (2013, 2016) e González (2015).

Finalmente, fazendo uma análise global do estado de desenvolvimento do BEVT descrito acima, somado à constatação de uma substancial carência de dados na literatura deste equipamento no cultivo com CEMs adultas, é necessário destacar

a importância de informações sobre esse biorreator no que se refere à caracterização hidrodinâmica e funcional em cultivo. Portanto, o foco principal do presente trabalho será a avaliação de parâmetros de grande relevância prática no cenário de cultivo celular como o critério de suspensão ou velocidade mínima de suspensão (N_{s1}), importante para assegurar um certo grau de dispersão dos microcarregadores, maximizando a adesão célula-microcarregador e modulação da agregação (DELAFOSSÉ et al., 2018), e a capacidade de mistura através da quantificação do tempo de mistura (θ_m), que permitiram completar a caracterização hidrodinâmica do BEVT. Adicionalmente, uma validação mais realista do biorreator fazendo a expansão de CEMs primárias, usadas normalmente em tratamentos clínicos, extraídas de fontes de fácil obtenção e acesso como as recuperadas do cordão umbilical ou as obtidas do tecido adiposo foi indispensável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

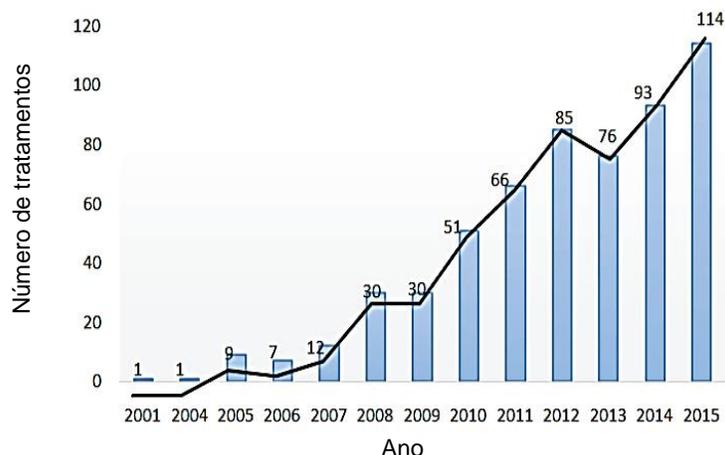
2.1 PROMESSA DO USO DE CEMs

Desde o início do século XXI, o rápido avanço nas pesquisas utilizando células estromais mesenquimais (CEMs) na medicina regenerativa, para o tratamento de doenças que até o momento careciam de resultados bem-sucedidos com os métodos tradicionais da medicina, tem levado à resultados de grande interesse. A medicina regenerativa, que inclui a engenharia de tecidos e terapia celular, atua na substituição de células danificadas por células funcionais para recuperar a funcionalidade de um determinado órgão ou tecido. Desta forma, a engenharia de tecidos envolve especificamente a reconstrução de um tecido ou órgão *in vitro* para ser posteriormente transplantado. Um exemplo disto, é a impressão 3D de ovários de ratos realizado no estudo de Laronda e colaboradores (2017), que foram posteriormente implantados em ratos inférteis para produzir descendentes saudáveis (LARONDA et al., 2017). Nesta mesma área, encontra-se a reconstrução de porções de osso, músculo, pele ou cartilagem a partir de diferentes fontes celulares (KANG et al., 2016; SCHOP, 2010).

Por outro lado, na terapia celular as CEMs são usadas para o tratamento de diversas doenças/desordens autoimunes e/ou degenerativas como Parkinson, Alzheimer, doença de Crohn, esclerose múltipla, infarto do miocárdio, anemia, diabetes, leucemia, problemas ósseos, queimaduras, úlceras, doenças metabólicas, entre outras (JUNG et al., 2012; NITKIN; BONFIELD, 2017). Considerando somente a terapia celular, segundo a Livraria Nacional de Medicina (NLM, em inglês), uma base de dados americana (www.clinicaltrials.gov), até o ano de 2015 foram registrados no mundo mais de 100 estudos clínicos que utilizam CEMs no tratamento de diferentes doenças, como pode ser observado na Figura 1. Dentre esses, 14 estudos estão sendo realizados no Brasil para o tratamento de anemia plástica, lesões do tendão, osteoartrite, lesão da medula espinal, entre outras. O sucesso nos resultados desses estudos, mostra-se promissor tanto para a terapia celular quanto para a engenharia de tecidos, aumentando

progressivamente o interesse no uso de CEMs e levando à necessidade de um processo de produção robusto e escalável para preencher a alta demanda comercial existente, assim como de um melhor conhecimento da fonte adequada de CEMs para ser usada em determinado tratamento (CUENCA et al., 2018).

Figura 1. Tendência do número de tratamentos clínicos registrados de CEMs baseados em terapia celular desde 2001 a 2015. Dados coletados de www.clinicaltrials.gov.



Fonte: Chen et al., (2016)

2.2 CÉLULAS TRONCO (CTs)

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, em inglês) as células estromais mesenquimais (CEMs) podem ser definidas a partir de três critérios principais: 1) As CEMs são dependentes de ancoramento quando mantidas em condições de cultivo padrão, 2) As CEMs expressam marcadores de superfície CD105, CD73, CD90 e carecem da expressão de CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79-alpha ou CD19 e HLA-DR e 3) As CEMs têm o potencial de diferenciação *in vitro* em osteócitos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI et al., 2006). Outra característica importante a ser mencionada é a capacidade de autorrenovação celular, apresentando uma divisão assimétrica, gerando a partir de uma célula, duas células filhas diferentes, das quais uma é idêntica à célula progenitora (não diferenciada) e a outra está comprometida com a via de diferenciação (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008). Esta

habilidade de auto- renovação e replicação está ligada com o comprimento dos telômeros, que são reduzidos em cada divisão celular, refletindo a idade ou senescência da célula, influenciando no seu potencial de crescimento durante o cultivo (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

Por outro lado, as CTs podem ser divididas em embrionárias e adultas: ambas são descritas sumariamente a seguir.

2.2.1 Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTEs) são classificadas como pluripotentes, motivo pelo qual são consideradas uma fonte ilimitada para a obtenção de diferentes tipos celulares, sendo encontradas nos primeiros estágios do desenvolvimento celular (MARTIN, 1981; THOMSON, 1998). Contudo, por razões éticas, devido à necessidade de destruição do embrião para sua obtenção, o uso é restrito em alguns países ou limitado para pesquisas de CTEs provenientes de animais (MCLAREN, 2001; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015; ZUR NIEDEN et al., 2007). Além disso, as CTEs tendem a formar teratomas após a implantação em razão de sua capacidade tumoral inata, outro fator que restringe sua aplicação (RODRIGUES et al., 2011).

2.2.2 Celulas Estromais Mesenquimais (CEMs) adultas

As CEMs adultas podem ser divididas em germinativas e somáticas. As germinativas são células unipotentes que dão origem aos ovócitos e espermatozoides (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008). As células somáticas, consideradas multipotentes, são encontradas em diferentes tecidos e órgãos de um indivíduo após o desenvolvimento embrionário, constituindo um reservatório de células envolvidas na manutenção e reparação dos tecidos ao longo da vida de um indivíduo (JAZEDJE et al., 2009; O'CONNOR; CRYSTAL, 2006). Dessa forma, essas células são encontradas na medula óssea, endométrio do útero,

fígado, pulmão, músculo, líquido amniótico, pâncreas, polpa dentária, pele (SCHUSTER; MARTENS; ITESCU, 2008; ZUK et al., 2002), placenta (HEWITT et al., 2011), cordão umbilical (ARIAS; FELMER, 2009), cérebro (TEMPLE, 2001), trompas de Falópio (JAZEDJE et al., 2009), tecido adiposo (ZUK et al., 2001) e fluido menstrual (CUENCA et al., 2018), sendo capazes de promover a regeneração *in vivo*. Além disso, a capacidade de diferenciação *in vitro* das CEMs adultas em adipócitos, condrócitos e osteócitos tem sido bem documentada na literatura (BAKSH; SONG; TUAN, 2004; DARIOLLI et al., 2013; KERN et al., 2009; PITTENGER et al., 1999; SCHOP et al., 2010), assim como, em células neurais e de músculo (DARIOLLI et al., 2013; LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015; ZUK et al., 2002) evidenciando sua plasticidade. Em vista disso, as CEMs adultas são consideradas uma alternativa mais adequada para uso na terapia celular, uma vez que não geram tumores ou rejeições quando extraídas do mesmo paciente (autólogas) ou de doadores (alôgenas) (PANÉS et al., 2016). Outra alternativa que vem sendo explorada são as células adultas especializadas (diferenciadas) geneticamente modificadas, nomeadas células-tronco pluripotentes induzidas (CTPI) (YAMANAKA, 2007), embora sua estabilidade genômica é ainda questionada (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

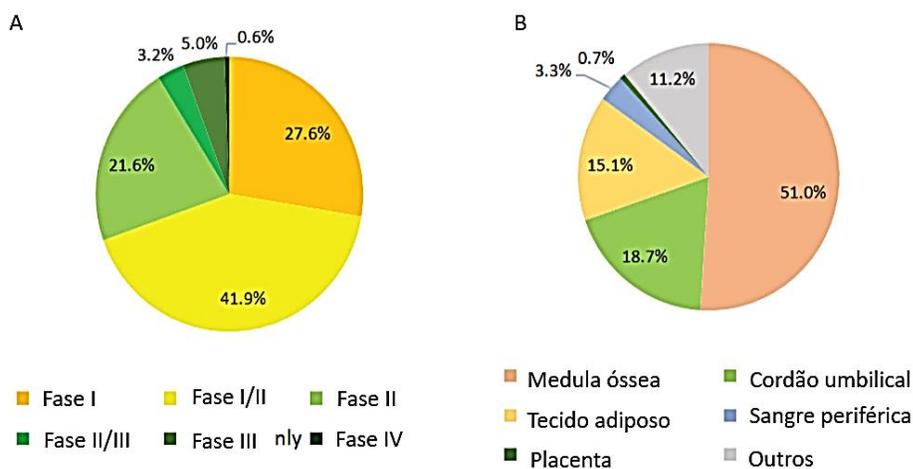
Nos estudos de expansão laboratorial, linhagens de CEMs também podem ser usadas como modelo na padronização em experimentos (WEBER et al., 2007). A linhagem de células estromais mesenquimais humanas hMSC-TERT, derivada da medula óssea e imortalizada pela expressão da subunidade catalítica da enzima telomerase, hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), é um modelo comumente utilizado. A expressão dessa enzima neutraliza o encurtamento progressivo dos telômeros, processo que ocorre a cada divisão, inibindo a senescência celular (ALLSOPP; HARLEY, 1995), e permitindo que as células tenham pouca ou nenhuma variação nas características biológicas, mantendo seu caráter multipotente e a capacidade de autorrenovação durante uma série de passagens, facilitando a avaliação inicial de processos ou equipamentos (ABDALLAH et al., 2005).

Outras fontes que atualmente estão sendo usadas nos diferentes estudos, são as CEMs primárias extraídas de fontes de fácil acesso e obtenção, como exemplo as obtidas através do tecido adiposo (CEMs-TA) (ZUK et al., 2002), cordão umbilical (CEMs-CU), fluido menstrual (CUENCA et al., 2018), placenta ou fluido amniótico (ILANCHERAN; MOODLEY; MANUELPILLAI, 2009). Estas CEMs são interessantes devido a que são obtidas através de procedimentos não invasivos, em comparação às células extraídas da medula óssea, comumente utilizadas há poucos anos apesar de ter mostrado declínio de suas características com a idade do paciente do qual são extraídas (ILANCHERAN; MOODLEY; MANUELPILLAI, 2009). Adicionalmente, as fontes pré-natais, como o cordão umbilical, apresentaram grande quantidade de CEMs com alta estabilidade, mesmo a partir de diferentes doadores, e um maior potencial de propriedades imunomodulatórias quando comparadas às obtidas através da medula óssea (WEGMEYER et al., 2013). O potencial terapêutico de CEMs de cordão umbilical também tem sido avaliado, a partir de estudos no tratamento de paralisia cerebral (ROMANOV et al., 2015) e displasia broncopulmonar (clinicaltrials.gov; NCT02381366).

As CEMs derivadas do tecido adiposo (CEMs-TA), podem ser obtidas a partir do “descarte” dos processos de lipoaspiração (JAZEDJE et al., 2009), facilitando a extração de um grande volume de tecido (RODRIGUEZ et al., 2005), que contém uma quantidade de unidades formadoras de colônias 500 vezes maior do que a medula óssea (FRASER et al., 2006). Considerando que o Brasil está no segundo lugar do ranking mundial de cirurgias plásticas estéticas do mundo (até 2015), com a lipoaspiração como um dos procedimentos mais comuns segundo a Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS) e a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBPC), esta fonte pode ser uma das mais importantes para a obtenção de CEMs-TA. Adicionalmente, as CEMs-TA têm apresentado resultados similares e em alguns casos melhores em questões de isolamento e senescência em comparação com as CEMs provenientes de outras fontes (KERN et al., 2009), apresentando alta viabilidade (90-95%), expressão de marcadores de superfície e ausência de mudanças morfológicas, após cinco passagens ou posterior ao processo de descongelamento (DARIOLLI et al., 2013). Por outro lado, Zuk e

colaboradores em 2002, mostraram o potencial das CEMs-TA para serem precursoras do fenótipo neuronal, além da capacidade de diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos (ZUK et al., 2002). No que se refere às aplicações em terapias celulares, resultados bastante satisfatórios e animadores para o tratamento de algumas doenças degenerativas estão sendo apresentados, como exemplo, o uso de CEMs-TA alogênicas no tratamento de fístulas perianais da doença Crohn, uma doença que somente nos Estados Unidos afeta, em média, cerca de 201 pessoas a cada 100.000 habitantes (DE LA PORTILLA et al., 2013; PANÉS et al., 2016). Atualmente, as CEMs derivadas de medula óssea são ainda as mais usadas em tratamentos clínicos com 51 %, seguidas das CEMs-CU e TA com 18,7 % e 15,1%, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. (A) Registro de tratamentos clínicos de CEMs classificados por fase clínica; (B) CEMs de diferentes fontes aplicadas em tratamentos clínicos atualmente. Dados coletados de www.clinicaltrials.gov.



Fonte: Chen et al., (2016)

Apesar da quantidade de fontes disponíveis de CEMs adultas, a problemática principal está relacionada às baixas porcentagens (por exemplo $\leq \sim 0,001-0,01$ % de células mononucleares na medula óssea) obtidas das diferentes fontes (CAPLAN, 2007; PITTENGER et al., 1999; WEGMEYER et al., 2013), insuficientes para aplicações terapêuticas devido às altas doses de CEMs necessárias para iniciar um tratamento conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Tipo de célula, doença e dose estimada necessária por paciente.

| Indicação | Fonte de célula | Dose para tratamento clínico (células/dose) |
|--|---|---|
| Lesão renal aguda | hMSC de medula óssea | 2×10^8 |
| Infarto miocárdio | hMSC de medula óssea e outras | $0,2- 3,5 \times 10^{8*}$ |
| Insuficiência cardíaca congestiva | Células precursoras mesenquimais derivadas de medula óssea | $1,5 \times 10^8$ |
| Isquemia crítica do membro | hMSC derivadas de placenta | $1,5-3 \times 10^8$ |
| Doença de Crohn | hMSC derivadas de gordura e de medula óssea | $2,4 \times 10^7$; $6-12 \times 10^8$ |
| Degeneração macular relacionada ao olho seco | Células embrionárias derivadas do epitelial pigmentar da retina | $0,5-2 \times 10^5$ |
| Doença do enxerto vs hospedeiro | hMSC derivadas de cordão umbilical; hMSC derivadas de medula óssea; hMSC derivadas de medula óssea ou outros pós-natais | $1-5 \times 10^8$; $1,6 \times 10^9$; $0,5-1 \times 10^9$ |
| Hemorragia intracerebral | hMSC derivadas de medula óssea | $7,8 \times 10^6$ |
| Doença de fígado | hMSC derivadas de gordura | $0,1-1 \times 10^9$ |
| Osteoartrite | hMSC derivadas de medula óssea; hMSC derivadas de cordão umbilical | $5-15 \times 10^7$; $3,5 \times 10^7$ |
| Doença vascular periférica | hMSC derivadas de sangue menstrual | $0,25-1 \times 10^8$ |
| Câncer de próstata | Células derivadas de tumor da próstata | $2-4 \times 10^7$ |
| Artrite reumática | hMSC derivadas de gordura | $1-4 \times 10^8$ |
| Lesão da medula óssea | hESC; hNSC | 2×10^6 , 2×10^7 , 1×10^8 |
| Diabetes tipo I | hMSC derivadas de medula óssea | 6×10^8 |
| Diabetes tipo II | hMSC derivadas de medula óssea | $0,1, 0,3, 1, 2 \times 10^8$ |
| Colite ulcerativa | hMSC de medula óssea | $1,8 \times 10^8$ |

Fonte: SIMARIA et al., 2014. *(HEATHMAN et al., 2015)

Nessas circunstâncias a produção intensificada de CEMs adultas com a preservação de suas características para fins clínicas tornou-se necessária. Devido à necessidade de ancoramento das CEMs, a expansão tradicional *in vitro* tem sido em frascos e placas de poliestireno modificado, facilitando um crescimento em formato 2D. Embora essa forma de expansão seja simples, ela apresenta algumas desvantagens relacionadas com altos custos de material e mão de obra, variabilidade das características das células por lote e dificuldade no controle de parâmetros como oxigênio, concentração de nutrientes, pH, entre outros (MA; TSAI; LIU, 2016; SIMARIA et al., 2014; TOZETTI et al., 2017). Apesar da existência de um processo mais automatizado para aumentar o potencial do cultivo em 2D, como o sistema Compact Select™, vendido pela empresa Sartorius Stedim, desafios no escalonamento são evidentes considerando a demanda comercial atual.

2.3 CULTIVO DE CEMs ADULTAS EM LARGA ESCALA

Por outro lado, está a expansão de CEMs em 3D com o uso de biorreatores e microcarregadores, que apresenta vantagens sobre o 2D, em relação ao potencial terapêutico por mostrar diferenças em padrões de expressão de genes, forma e regulação do crescimento, indução a morfogêneses e diferenciação, e maior produtividade (SERRA et al., 2007; YAMADA; CUKIERMAN, 2007). Esses atributos mostrados com o crescimento em 3D, podem estar relacionadas com a similaridade estrutural apresentada com o ambiente *in vivo*, no qual prevalecem mecanismos necessários de comunicação celular para a execução de vários dos processos que ocorrem no organismo, e que envolvem várias proteínas de adesão encontradas na superfície da membrana celular, como as E-caderinas, participando na comunicação célula-célula, e as integrinas envolvidas na interação das células com a matriz extracelular (MEC) (SART et al., 2014; SINGH et al., 2010). A importância destas interações confirma-se, por exemplo, na coordenação dos batimentos cardíacos, ou nos processos de diferenciação ou regeneração de algum órgão ou tecido específico.

Os microcarregadores, necessários devido à dependência das CEMs de ancoramento, são partículas caracterizadas por ter diâmetros aproximados entre 100 e 300 μm e uma densidade similar ao do meio de cultura para facilitar sua suspensão. Os microcarregadores são fabricados a partir de vários tipos de materiais para favorecer a adesividade celular, podendo ser classificados como sólidos, micro-porosos ou macro-porosos. Os microcarregadores sólidos e micro-porosos têm como desvantagens a baixa relação área/volume, minimizando o potencial de expansão celular por partícula (NG; BERRY; BUTLER, 1996), e maior vulnerabilidade das células ao ambiente hidrodinâmico apresentado dentro do biorreator por causa da agitação (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1988; YUAN et al., 2014). Por outro lado, os microcarregadores macro-porosos oferecem uma maior relação área/volume, permitindo o crescimento de células no interior dos poros, protegendo-as de tensões hidrodinâmicas provocadas pelo movimento do fluído e de colisões entre as partículas (CHEN; REUVENY; OH, 2013; NG; BERRY; BUTLER, 1996).

Por outro lado, os biorreatores são equipamentos que permitem manter um ambiente estável com condições controladas, visando mimetizar o ambiente *in vivo* para a expansão de CEMs em escala clínica. Os sistemas baseados no uso de biorreatores podem ser mais automatizados, oferecendo diferentes modos de operação e contando com a tecnologia *single-use* (descartáveis), evitando a variabilidade e riscos de contaminação durante o cultivo. A descrição dos principais biorreatores usados para células dependentes de ancoramento é apresentada a seguir.

2.3.1 Biorreatores para expansão de células aderentes

Biorreator de tanque agitado

O tanque agitado (*Stirred tank bioreactor*, STB, em inglês) ou frasco *Spinner*, em escala de bancada, (Figura 3A e 3B, respectivamente) é o biorreator clássico

caracterizado por ser simples e de fácil operação, consistindo de um tanque com um impelidor que pode ter várias características geométricas, para proporcionar um certo grau de mistura desejado. O tanque agitado é o equipamento mais empregado pelo conhecimento empírico ganhado em termos de performance, escalonamento e operação em vários processos industriais incluindo os biotecnológicos, na produção de biofármacos como vacinas e proteínas recombinantes (CHALMERS, 2015), sendo atualmente fabricado com tecnologia *single-use* por proporcionar maior segurança ao paciente e reduzir risco de contaminação cruzada.

A principal desvantagem do tanque agitado no cultivo de células é a heterogeneidade em termos de tensões de cisalhamento (ISMADI; HOURIGAN; FOURAS, 2014; KAISER et al., 2013; LIOVIC et al., 2012). Embora ainda não exista um consenso da faixa de condições hidrodinâmicas adequada, um parâmetro muito usado é o critério de suspensão (N_{s1}), que proporciona uma condição de mínima tensão de cisalhamento, importante no cultivo de células animais devido à maior sensibilidade ao ambiente hidrodinâmico. Usando esta condição, estudos recentes têm apresentado resultados promissores, como o trabalho de Jossen e colaboradores, usando neste caso uma velocidade de agitação de 41 rpm (N_{s1}) para o cultivo de uma linhagem de CEMs-AT, no qual foi atingido uma concentração de $8,77 \pm 0,66 \times 10^5$ células/mL, equivalente a um fator de expansão de 82, e agregados com tamanhos entre 0,1 e 1 mm após 9 dias (JOSSEN et al., 2018). Neste trabalho, os pesquisadores também mencionam agregação excessiva e o aumento dos valores de atividade relativa de LDH, usado como medida representativa de morte celular, em condições de agitação menores às do N_{s1} . Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, foi atingida uma concentração de $1,25 \pm 0,05 \times 10^6$ células/mL e um tamanho de agregados médio de $\sim 0,7$ mm usando o critério N_{s1u} (49 rpm), representando o menor limite do N_{s1} . Usando o critério usando o N_{s1} (63 rpm), foi obtida uma densidade celular de $1,11 \pm 0,06 \times 10^6$ células/mL e um tamanho médio de agregados de $\sim 0,6$ mm. Neste estudo, a diminuição na viabilidade celular foi causada pela excessiva agregação, em condições menores do N_{s1} (25 rpm), ou altas tensões de cisalhamento locais ($0,437 \text{ N/m}^2$), em condições maiores do N_{s1} (120 rpm) (JOSSEN et al., 2016).

A tendência à excessiva e heterogênea agregação, representam outras desvantagens, devido as dificuldades no processo recuperação celular durante e no final do cultivo (CARUSO et al., 2014; JOSSEN et al., 2016; KAISER et al., 2013). Um dos poucos estudos bem sucedidos no controle da agregação usando o tanque agitado, foi o realizado por Lawson e colaboradores, utilizando uma velocidade de rotação ligeiramente acima do N_{S1} e a adição de microcarregadores após 7 dias, obtendo uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL após 11 dias (LAWSON et al., 2017). Apesar que este estudo não ofereceu dados quantitativos do tamanho dos agregados durante o cultivo, mostram a importância da relação das características hidrodinâmica do biorreator, considerando aumentos progressivos na velocidade de agitação, e composição e trocas do meio durante o cultivo. Emprego de métodos computacionais também permitem ter uma boa aproximação das condições hidrodinâmicas mais adequadas para ser usado cultivo de células aderentes.

Alternativas de biorreatores minimizando as dificuldades do tanque agitado, relacionadas com o estresse hidrodinâmico causado pela agitação foram surgindo posteriormente. Dentre estes, estão o wave-rocking, leito fixo, fibra oca, roda vertical e os sistemas de cultivo celular rotativos descritos a seguir.

Biorreator Wave-rocking

O Wave-rocking (Figura 3F), outro biorreator com a tecnologia single-use, consiste de uma bolsa de plástico tratada posicionada sobre uma plataforma horizontal móvel com frequência e ângulo para agitação ajustáveis, que oferecem um movimento moderado, mas que permite atingir uma adequada oxigenação, favorecida também pela ampla área de líquido para difusão. O Wave-rocking é caracterizado por oferecer uma adequada mistura com baixas tensões de cisalhamento comparado com o tanque agitado. Este biorreator tem sido usado com sucesso para o cultivo de células em suspensão (DECARLI et al., 2018), entretanto, as CEMs têm sido raramente cultivadas neste sistema, devido a aparição de depósitos de microcarregadores “tipo duna” observados nas extremidades da bolsa (JOSSEN et al., 2016). Jossen e colaboradores também mencionaram a formação

excessiva e heterogênea de agregados, com valores máximos de 6 mm de diâmetro no final do cultivo de CEMs-TA, apesar de ter atingido um fator de expansão de 9 vezes, sendo estas as principais desvantagens do O Wave-rocking para o cultivo de células aderentes.

Biorreator de leito fixo

Neste biorreator, as células são imobilizadas em uma matriz estacionária através da qual o meio de cultivo passa para proporcionar os nutrientes necessários e remover metabólitos tóxicos. A empresa FibraStage® (New Brunswick Scientific, EUA), oferece o biorreator comercialmente com a tecnologia *single-use* para trabalhar com um volume máximo de 500 mL e conta com uma área de 12000 cm² de discos de fibra para crescimento celular. A disposição das fibras facilita a interação célula-célula através da formação de uma estrutura em 3D, à medida que a densidade celular vai aumentando, proporcionando baixas tensões de cisalhamento (Figura 3C). Mizukami e colaboradores, usaram o biorreator de leito fixo para cultivar células extraídas da medula óssea, atingindo concentrações celulares máximas de $4,15 \pm 0,8 \times 10^8$ células, correspondendo a um fator de expansão de $7,0 \pm 1,4$. Contudo, a porcentagem de recuperação foi de apenas $18 \pm 0,77$ %, embora fosse realizado dois ciclos de tratamento enzimático para desaderir as células das fibras, sendo está a principal problemática apresentada por este tipo de biorreator (MIZUKAMI et al., 2013). Adicionalmente, com o aumento de escala deste biorreator tende a sofrer gradiente de concentração na direção axial dependendo de como o meio passa através do leito (HEATHMAN et al., 2015).

Biorreator de fibra oca “hollow fiber”

Este biorreator consiste de duas partes que são divididas: em espaço extracapilar, onde as células crescem em formato 2D, e intracapilar, onde circula o meio de cultura permitindo a transferência de nutrientes e metabólitos tóxicos (Figura 3E). O biorreator de fibra oca com tecnologia *single-use* é comercializado em um sistema automatizado nomeado Quantum® pela firma Terumo BCT

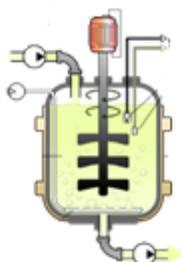
(Lakewood, Colorado, EUA). Usando este biorreator, Mizukami e colaboradores (2018) obtiveram uma alta taxa de proliferação, fator de expansão e funcionalidade celular, mostrando ser altamente promissório comparado com o tanque agitado (STB), leito fixo e frasco multicamadas. Contudo, esta tecnologia foi a opção menos favorável em termos de viabilidade econômica aplicado na terapia celular (MIZUKAMI et al., 2018). Limitações adicionais relacionadas com gradientes de concentração ao longo das fibras e baixo potencial de escalonamento também são características deste biorreator (HEATHMAN et al., 2015)

Biorreator de roda vertical

O biorreator de roda vertical (em inglês PBS-VW), também com a tecnologia *single-use*, é uma das propostas de biorreator para cultivo de células aderentes mais recentes. Esse biorreator consiste em uma roda que gira verticalmente dentro de um recipiente que possui forma de “U”, operando na faixa de volumes de trabalho entre 0,1 e 500 L (Figura 3D). Esta geometria propõe uma mistura rápida e eficiente com taxas de cisalhamento baixas em comparação com o STB. Com o PBS-VW operando à 17 rpm, Sousa e colaboradores (2015) atingiram uma concentração aproximada de 3×10^5 células/mL, representando um fator de expansão de 12, não sendo observadas diferenças significativas na taxa de crescimento específica nem na densidades celular, quando comparados com resultados obtidos no STB, usando velocidades de agitação de 40-45 rpm, no mesmo estudo (SOUSA et al., 2015). Apesar que neste estudo não foi mencionada a formação de agregados, Croughan e colaboradores, mencionam a distribuição heterogênea de células nos microcarregadores, assim como a formação de grandes agregados, a velocidades de rotação menores que 35 rpm (CROUGHAN et al., 2016). Em outro estudo, Yuan e colaboradores, apresentam os resultados do PSB-VW para facilitar a formação de agregados com tamanhos homogêneos e não maiores que 0,2 mm a velocidades de 60 rpm, quantificados apenas as 24 h (YUAN et al., 2018). Neste sentido, mais estudos precisam ser feitos para avaliar o real impacto da geometria deste biorreator na agregação.

Figura 3. Representação esquemática dos biorreatores utilizados para cultivo de CEMs.

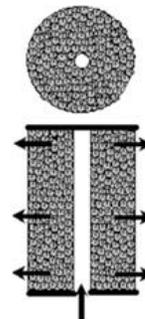
A. Biorreator Tanque agitado



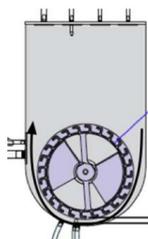
B. Frasco *spinner*



C. Biorreator de leito fixo



D. Biorreator de roda vertical



E. Biorreator fibra oca



F. Biorreator Wave



Sistemas de Cultura Celular Rotativos (SCCR)

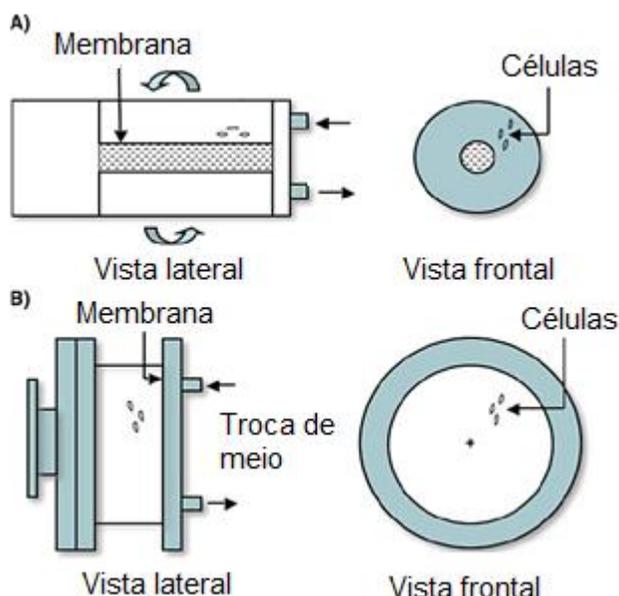
Outras duas tecnologias que trazem a proposta de baixas tensões de cisalhamento, foram as construídas pela Administração Nacional Aeronáutica e Espacial (NASA) na década dos 90, definidos como sistemas de cultura celular rotativos (SCCR), operando no eixo horizontal e caracterizados por simular um ambiente de microgravidade na terra (BULGHER et al., 2002). Um dos sistemas foi nomeado como frasco de giro lateral lento (STLV, em inglês), que consiste de um frasco de parede rotativa composto de dois cilindros concêntricos, onde os dois podem girar em direções iguais ou opostas ou só um deles, enquanto o outro permanece estacionário, sendo que a hidrodinâmica mais interessante ocorre

quando somente o cilindro interno gira, permitindo a presença de uma variedade de regimes com formação de vórtices do fluido confinado no espaço anular entre os dois cilindros concêntricos, ausentes nas outras configurações do biorreator. Por outro lado, o outro SCCR consiste de um único cilindro, nomeado frasco de alta relação de aspecto (em inglês HARV), permitindo a troca de gases através de uma membrana, duas vezes maior que a do STLV, localizada no cilindro interno, em uma das extremidades do frasco. Os dois sistemas desenvolvidos para trabalhar em baixas velocidades de rotação, normalmente entre 12-15 rpm (MARTIN; VERMETTE, 2005). Na Figura 4 são apresentados os dois tipos de biorreatores.

Nos SCCR da NASA, as tensões de cisalhamento que atuam sobre as células e tecidos são “baixas”, permitindo o contato entre as células e facilitando a agregação. Contudo, alguns problemas, especificamente com o HARV, como sedimentação, dificuldade de suspensão de grandes partículas, formação de grandes agregados celulares ou agregados de células-microcarregadores, tensões de cisalhamento exponencialmente crescentes com o aumento do raio de partículas, colisão das partículas com as paredes e dificuldade de escalonamento, acabam limitando o uso desses biorreatores para cultivos em suspensão com células aderentes (LIU et al., 2004).

Um estudo de otimização destes sistemas para cultivo com agregados foi apresentado pelo grupo de Hammond e Hammond, mencionando as dificuldades destes equipamentos devidas, principalmente, a um balanço de forças: gravidade e mecânicas, que incluem as centrífugas e coriolis, de igual magnitude e opostas, que com a presença de grandes partículas terminam gerando cisalhamento, sedimentação e colisões com as paredes. As principais propostas de otimização desse grupo, estão relacionadas com o uso de baixas velocidades de rotação e de densidades do meio e das partículas próximas. Considerando o cultivo em suspensão de células aderidas à microcarregadores, essas opções são de difícil manutenção pelas limitações na transferência de massa, devido às baixas velocidades de rotação, e tendência à formação de agregados que terminariam afetando a obtenção e renovação de nutrientes nos agregados (HAUT et al., 2003).

Figura 4. Esquema do STVL e o HARV, desenho da esquerda e direita, respectivamente.



Fonte: Andrade-Zaldívar; Santos; De León Rodríguez, (2008)

Liu e colaboradores (2004), realizaram um estudo de verificação da relação entre a trajetória de partículas variando a densidades e tamanhos destas, em diferentes velocidades de rotação dos cilindros interno e externo, observando que as partículas localizadas na parte inferior do equipamento sofrem sobrepeso, enquanto que as partículas localizadas na parte superior experimentam um ambiente parcial de microgravidade (LIU et al., 2004). No que se refere às forças de cisalhamento do fluido e à dependência do tamanho das partículas, partículas com tamanhos de 50 μm sofreriam tensões de cisalhamento entre 0,180 e 0,320 N/m^2 (1,8 e 3,2 dina/cm^2 , respectivamente), partículas entre 50 e 200 μm de $\sim 0,5 \text{ N/m}^2$ (5 dina/cm^2) e partículas com tamanhos entre 200 e 300 μm , semelhantes ao tamanho dos microcarregadores, experimentaríamos tensões entre 0,520 e 0,780 N/m^2 (5,2 e 7,8 dinas/cm^2 , respectivamente) (ULBRICH et al., 2014).

Outros estudos realizados relataram mudanças em processos biológicos relacionadas ao desenvolvimento normal das células, como comunicação, processos de sinalização e respostas ao estresse, pelas condições de “microgravidade”, mesmo com resultados de alta viabilidade (BULGHER et al.,

2002; FRANCIS; CONNOR; SPAULDING, 1997). Resultados de cultivo com a linhagem de células pc12, derivada do feocromocitoma da medula suprarrenal de rato, apresentaram um incremento de até cinco vezes no consumo de glicose, atividade metabólica, agregação e taxa de proliferação (UNSWORTH; LELKES, 1998). Em outro estudo realizado com CEMs humanas, foi observado que mais de 50 % dos genes avaliados estavam sendo expressados em maior ou menor proporção do que o normal, também foram evidenciadas variações no processo de diferenciação, apresentando uma maior tendência à diferenciação adipogênica (SHEYN et al., 2010). Por outro lado, comparações de tecidos cultivados neste ambiente de microgravidade tenderam a ser mais fracos e pequenos, permitindo proporcionar um melhor entendimento do processo de degeneração musculoesquelética que sofrem os astronautas nas viagens espaciais (BULGHER et al., 2002), mas também evidenciando as consequências deste ambiente no funcionamento normal das células.

Adicionalmente, esses dispositivos construídos sob o eixo horizontal apresentam dificuldade de escalonamento, sendo problemático em sistemas com volumes maiores que 500 mL, limitando o seu emprego em várias aplicações de cultura celular (AZARIN; PALECEK, 2010; LIU et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011).

2.3.2 Biorreatores de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT)

Outra configuração dos sistemas SCCR de cilindros concêntricos com o externo estático e o interno rotatório, é o BEVT operado sobre o eixo vertical. As primeiras hipóteses sobre a estabilidade e instabilidade de um fluido não viscoso confinado neste sistema, foram apresentadas a partir de 1687 por vários pesquisadores, incluindo I. Newton, W. J. Harrison, Stokes e Lord Rayleigh. Com base nestas observações foi construído o viscosímetro por Mallock em 1888, e em 1923, o desenvolvimento matemático realizado por G. Taylor, "Stability of a viscous liquid between rotating cylinders", baseado em uma teoria para fluidos viscosos, permitiu estabelecer as condições de rotação do cilindro interno, críticas para a

formação de diferentes regimes de fluxo. Coles em 1965, usou traçadores metálicos neutros para apresentar estas transições, definindo as características de movimento de quatro regimes principais. O primeiro estável com movimento circunferencial, apresentado a baixas velocidades de rotação, é o laminar-Couette (Figura 5a). Este padrão de fluxo não possui componentes de velocidade axial, sendo o escoamento do fluido confinado à direção azimutal com gradientes de velocidade na direção radial, dessa forma, o transporte de massa que ocorre na direção axial é dado somente por mecanismos de difusão, assemelhando-se com um sistema de fluxo em pistão (CURRAN; BLACK, 2005b).

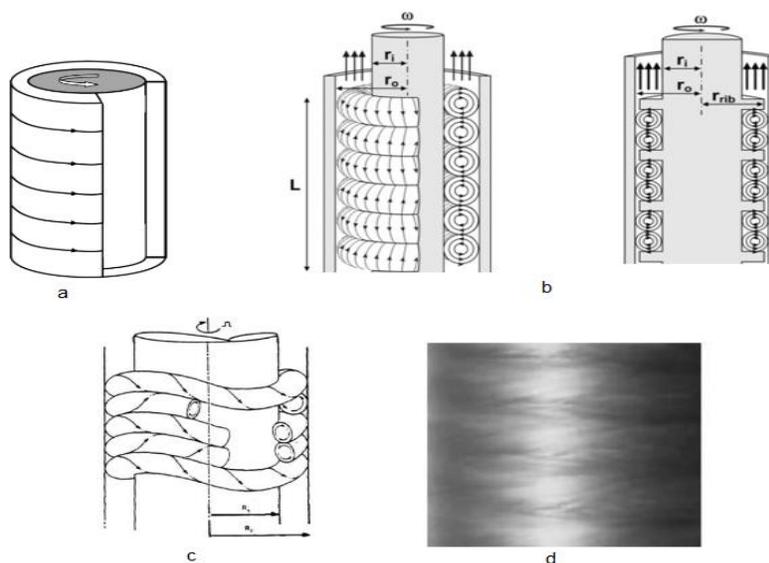
O segundo escoamento, que surge a partir de uma velocidade crítica do cilindro interno, é caracterizado pela aparição uma série de vórtices toroidais simétricos em contra-rotação preenchendo o espaço anular entre os cilindros, nomeado regime de fluxo em vórtice de Taylor (FVT) (Figura 5b). Esses vórtices toroidais são caracterizados por apresentarem um movimento do fluido em três direções: azimutal, radial e axial, este último em menor proporção. Na década de 90, vários estudos assemelhavam as estruturas dos vórtices como uma série de CSTR (KATAOKA et al., 1975), ideia que foi posteriormente apresentada como inválida por outros estudos que verificaram que no regime FVT prevalece a presença de duas zonas de mistura principais, zonas externa e interna, sendo a primeira dominada por processos de convecção que permitem o transporte entre os vórtices adjacentes nas regiões próximas da parede, representando uma zona com elevado grau de misturada; enquanto que a zona interna é dominada principalmente por processos moleculares difusivos, que promovem um mistura lenta e baixa (DESMET; VERELST; BARON, 1996; NEMRI; CHARTON; CLIMENT, 2016).

Continuando com um incremento na velocidade de rotação, é sobreposto o regime de fluxo em vórtices wavy (FVW) (Figura 5c), caracterizado por apresentar um escoamento com movimento ondulado nos vórtices, permitindo um aumento considerável da transferência de massa na direção axial. As perturbações no regime FVW tem dois efeitos significativos em partículas em suspensão, o primeiro, é a perda da simetria rotacional pelo campo de velocidade dependente das três coordenadas espaciais e do tempo, isto faz que o movimento das partículas seja

caótico permitindo uma mistura intra-vórtice. O segundo efeito está relacionado com o rompimento dos limites separando os vórtices adjacentes. Estes dois movimentos permitem o fluxo de elementos passando de um vórtice para outro, resultando em mistura inter-vórtice, causando a mudança da forma dos vórtices, que tendem a encolher-se gradualmente pela perda de fluido nos vórtices adjacentes, produzindo um aumento drástico no coeficiente de dispersão (NEMRI et al., 2013).

Finalmente, com um incremento suficientemente da velocidade de rotação, surge o regime turbulento (Figura 5d), onde as fronteiras dos vórtices tornam-se difíceis de discernir, ficando indefinidas, e o coeficiente axial é incrementado em cinco ordens de magnitude mais que o coeficiente de difusão molecular, permitindo um aumento enorme no transporte de massa (CURRAN; BLACK, 2005a, 2004; MOORE, 1994; NEMRI et al., 2013; TAM; SWINNEY, 1987).

Figura 5. Desenho esquemático do escoamento de líquido entre dois cilindros concêntricos, com o externo fixo e o interno rotatório: a) regime laminar-Couette, b) regime de fluxo em vórtices de Taylor (FVT), c) regime de fluxo wavy (FVW) e d) regime de fluxo turbulento.



Diversos estudos têm empregado este equipamento, acrescentando um maior entendimento da estrutura dos vórtices e na eficiência nos processos de mistura. Os primeiros estudos encontrados na literatura foram os realizados por

Kataoka e colaboradores em 1975, 1986 e 1997, que estudaram os processos de transferência de massa e calor entre os vórtices; outros estudos focalizaram mais nas características de mistura e tensões de cisalhamento nos diferentes regimes através de medições experimentais usando técnicas óticas como PLIF (*Planar laser-induced fluorescence*, em inglês) e programas de simulação de fluídos (CAMPERO; VIGIL, 1997; CURRAN; BLACK, 2004; DESMET; VERELST; BARON, 1996; GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; OHMURA et al., 1997). Portanto, sendo estudado em áreas como eletroquímica (LEGRANDT; COEURET, 1986), processos enzimáticos (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; MOORE, 1994), fotocatalise (SENGUPTA; KABIR; RAY, 2001), procedimentos clínicos (SCIENCES, 1999) e cultura celular (CURRAN; BLACK, 2005a; SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011).

Mais recentemente, Nemri e colaboradores (2013, 2014 e 2016), estudaram a dispersão axial e a caracterização dos regimes FVT e FWV em função do número de Reynolds (Equação 1) em dois modelos, observando as transições de cada um deles como apresentado na Tabela 2.

$$Re = \frac{\Omega_{int} r_{int} (r_{ext} - r_{int})}{\nu} = \frac{\Omega_{int} r_{int} (d)}{\nu} \quad \text{Equação 1}$$

sendo Ω_{int} a velocidade de rotação do cilindro interno (rad/s), r_{ext} e r_{int} o raio do cilindro externo e interno (m) respectivamente, e ν a viscosidade cinemática (m²/s).

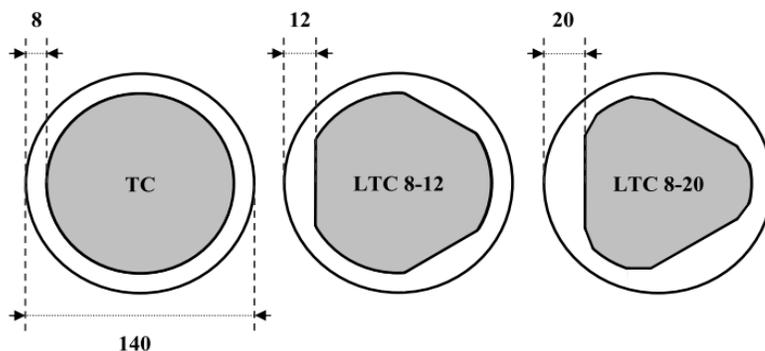
Tabela 2. Características de escoamento de líquido entre dois cilindros concêntricos, com o externo fixo e o interno rotatório, com valores da relação de raios (η) diferentes.

| REGIMES DE FLUXO | TRANSIÇÃO DE Re ($\eta=0,687$) | TRANSIÇÃO DE Re ($\eta=0,85$) |
|------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Transição a FVT | Re _c = 79 | Re _c = 125 |
| Presença de FWV | 387 < Re < 1793 | 165 < Re < 680 |
| FWV Modulado | 1793 < Re < 2133 | 680 < Re < 1150 |
| Fluxo Turbulento | Re > 2133 | Re > 1150 |

Fonte: Nemri et al., (2013).

De forma semelhante, mudanças nas faixas dos padrões de fluxo de três configurações do cilindro interno (Figura 6), foram observadas por Tanzeglock (2008), notando a necessidade de inserir maior potência para obter o mesmo padrão de escoamento, quando o cilindro interno é mais arredondado (TC), que quando há uma modificação da seção transversal do cilindro (LTC 8-12 e LTC 8-20) (TANZEGLOCK, 2008). Nestas geometrias do cilindro interno modificadas, vantagens em termos de mistura, por eliminação de zonas segregadas entre os vórtices, e taxas de cisalhamento mais homogêneas, comparadas com o TC e o tanque agitado, podem ser obtidas (SOOS; WU; MORBIDELLI, 2007).

Figura 6. Esquema de biorreatores Taylor-Couette usados no estudo de Tanzeglock, (2008).



Fonte: Tanzeglock, (2008).

Isto posto, e mantendo as principais características do BEVT, podemos ressaltar vantagens adicionais como:

1. Facilidade de escalonamento, com diminuição da magnitude relativa das tensões de cisalhamento, considerando que o espaço anular e o comprimento do reator permaneceram iguais, mantendo-se o tamanho dos vórtices (CURRAN; BLACK, 2004).
2. Altos valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), como observado por Gil (2015) e Santiago (2007), com oxigenação livre de bolhas, comparado com outros biorreatores.

3. Tensões de cisalhamento menores que 1N/m^2 , mesmo utilizando velocidades pouco comuns em cultivos celulares (maiores que 150 rpm). Estes cálculos obtidos para várias velocidades de rotação do cilindro interno, foram calculadas por Gil (2015) a partir de correlações empíricas encontradas na literatura e simulações usando dinâmica de fluidos computacional (CFD, em inglês).
4. Como uma consequência do numeral anterior, o BEVT é considerado apto para o uso de células animais, que são mais sensíveis ao estresse hidrodinâmico, devido à ausência de uma parede celular rígida de proteção (DUNLOP; NAMDEV, 1994).
5. A última vantagem observada foi a modulação e controle no tamanho de agregados em cultivos realizados com a linhagem hMSCs-TERT aderida a microcarregadores Cultispher®S, em regime turbulento. Tamanhos de agregados menores a $400\ \mu\text{m}$ foram obtidos, mostrando resultados promissores para cultivos com tendência à agregação (GIL, 2015).

Em contrapartida, têm sido mencionadas as limitações na transferência de massa no regime laminar-Couette e FVT, tanto em células vegetais como animais, evidenciado pela queda na viabilidade após poucas horas de cultivo devido à baixa transferência oxigênio (CURRAN; BLACK, 2005a; JANES; THOMAS; CALOW, 1987). Entre os poucos estudos encontrados na literatura do uso do BEVT para cultivo de células aderentes, então o realizado por Santiago e colaboradores (2011), que usaram uma membrana de silicone rodeando o cilindro interno para a injeção de ar no cultivado de células CHO-K1 aderidas ao microcarregador Cytodex 1, atingindo uma concentração e taxa específica de crescimento máximas de $9.6 \times 10^5\ \text{cells/mL}^{-1}$ e $2,1 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-3}\ \text{h}^{-1}$, respectivamente (SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011). Na Tabela 3, são apresentados outros trabalhos que utilizaram o BEVT, realizados com células em suspensão ou dependentes de ancoramento, evidenciando a importância da seleção das condições de operação adequadas, como a velocidade de rotação e injeção de ar, dependendo dos requerimentos das células e finalidade do processo.

Tabela 3. Trabalhos encontrados na literatura realizados com cultivo de células animais no BEVT.

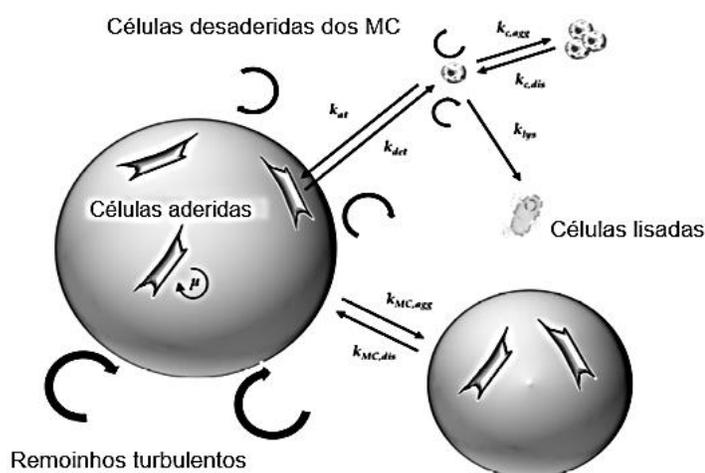
| Fator | JANES et al., (1987) | CURRAN, BLACK, (2005) | SANTIAGO et al., (2007) | ZHU et al., (2010) | Gil, (2015) |
|--|---------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|
| Regime de fluxo, eixo de trabalho | Laminar-Couette, vertical | FVT, Vertical | FVT, Vertical | FVT, Vertical | FVW e turbulento, vertical |
| Aeração forçada | Sim | Não | Sim | Não | Não |
| Tipo de célula | Beterrava | Fibroblasto | CHO-K1 | CEMs-MO rato | hMSC-TERT |
| Tipo de MC | Nenhum | Nenhum | Cytodex 1 | Scaffolds | Cultispher® S |
| Concentração máxima de células ($\times 10^6$) | ND | 80 % | 0,95 | 0,014 | 1,12 |
| FE | ND | ND | 4,3 | 3,5 | 8,18 |
| Duração (h) | 14 | 22 | 120 | 144 | 244 |

MC=Microcarregadores; FE= Fator de expansão.

2.3.3 Agregação em cultivo de CEMs dependentes de ancoramento

Em cultivos dinâmicos que usam biorreatores e microcarregadores, a tendência natural de formação de estruturas em 3D ou agregados, é observada tanto com CEMs adultas como embrionárias. Durante o cultivo, o modelo de crescimento pode estar representado pela proliferação das células sobre os microcarregadores e posterior formação de agregados de microcarregadores-células (Figura 7), facilitada pelo ambiente hidrodinâmico que promove colisões efetivas entre microcarregadores/agregados, a uma determinada velocidade de formação (k_x), permanecendo unidos por fios de MEC como pode ser observado na Figura 8.

Figura 7. Representação do modelo de crescimento em cultivo dinâmico de células aderentes e fatores influenciadores.

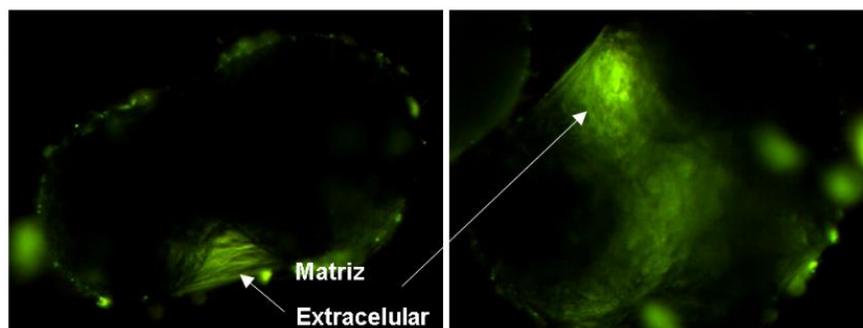


Fonte: Jossem et al., (2018).

Embora a formação de agregados é desejável, é um processo que precisa ser controlado para evitar dificuldades na recuperação celular durante e no final do cultivo, principalmente quando são usados microcarregadores macro-porosos (CARUSO et al., 2014; JOSSEN et al., 2016; KAISER et al., 2013; SCHIRMAIER et al., 2014). Isto devido à necessidade de tempos prolongados de exposição a tratamentos enzimáticos comumente usados, que auxiliam o processo de desagregação célula-microcarregador, que podem danificar a morfologia e fenótipo celular, ou até causar a morte das células mais expostas à enzima (GOH et al., 2013; LONG et al., 2014; NIENOW et al., 2014; POTAPOVA et al., 2008). Metodologias de otimização do processo de recuperação têm sido pouco relatadas na literatura. Entre as possíveis soluções está o uso de altas agitações durante curtos períodos de exposição (4-7 minutos) à enzima (CARUSO et al., 2014; NIENOW et al., 2014, 2016). Como outras possíveis alternativas, menciona-se o uso de microcarregadores ou hidrogéis manufaturados com materiais termossensíveis, omitindo a necessidade de enzimas para a recuperação das células (DUFFY et al., 2014; YANG et al., 2010). Adicionalmente, agregados com tamanhos maiores a 300-400 μm , tendem a formar centros necróticos pela falta de

oxigênio, nutrientes ou acumulação de metabólitos tóxicos, como lactato e amônia (KINNEY; SARGENT; MCDEVITT, 2011; SEN; KALLOS; BEHIE, 2001).

Figura 8. Agregados de microcarregadores Cultispher® S após 192 horas de cultivo de células primárias no Biorreator de Escoamento em Vórtices de Taylor (BEVT) a 100 rpm e em meio alfa MEM suplementado com 10% de SFB.



Fonte: Acervo pessoal.

Desse modo, a necessidade de controle do tamanho de agregados durante o cultivo é essencial para minimizar esses problemas e aumentar o rendimento do processo de obtenção celular em condições adequadas para uso terapêutico. Para isto, alguns dos métodos encontrados na literatura, envolvendo principalmente células embrionárias ou CTPIs, promovem o uso de agentes químicos ou métodos de dissociação mecânica, através de malhas com diâmetros de poro entre 50 e 70 μm , precisando-se de maior manipulação, devido à necessidade de procedimentos de reinoculação após o processo de filtração, e incrementando do estresse gerado pelo processo, resultando em pouca ou nenhuma solução para o cultivo de células dependentes de ancoramento (ABECASIS et al., 2017; OTSUJI et al., 2014; SART; BEJOY; LI, 2017). Outras alternativas utilizadas para evitar a agregação excessiva, são o uso de altas tensões de cisalhamento, aplicadas através do aumento da velocidade de agitação, ou a adição de substâncias visando aumentar a viscosidade do meio para diminuir a probabilidade de colisões que provoquem agregação (MOREIRA et al., 1995a, 1995b). Outra proposta encontrada foi a adição de microcarregadores durante o cultivo (FERRARI et al., 2012; LAWSON et al., 2017) ou o emprego de um biorreator com uma hidrodinâmica característica que possa ser usado para este fim, como o BEVT (GONZALEZ, 2015).

Considerando as características singulares da hidrodinâmica do BEVT, outros parâmetros como velocidade mínima de suspensão de partículas (N_{s1}) e tempo de mistura (θ_m), são também desejáveis para poder facilitar a escolha de condições apropriadas de rotação do cilindro interno, e permitir a comparação completa baseada em critérios técnico-científicos, com outros sistemas de cultivos que são utilizados atualmente na academia e indústria.

2.4 VELOCIDADE MÍNIMA DE SUSPENSÃO (N_{s1})

A velocidade mínima de suspensão ou N_{s1} , é uma medida da dispersão de sólidos em líquidos que permite garantir a suficiente mistura e suspensão de todas as partículas da fase sólida sem acumulações, visando maximizar a área disponível para transferência de massa, calor ou algum tipo de reação através da otimização das condições hidrodinâmicas (JAFARI; CHAOUKI; TANGUY, 2012; YOSHIDA et al., 2008). Nesse sentido, um processo que considera o critério N_{s1} , está sendo operado em condições de agitação ótimas, ou seja, que qualquer aumento adicional na potência inserida no sistema, proporcionaria pouco ou nenhum benefício, embora isso não garanta uma dispersão homogênea dos sólidos no volume do líquido (Kneule 1956 apud ZWIETERING, 1957). Outra condição para sistemas bifásicos encontrada na literatura é o critério N_{s1u} , que considera o limite menor do N_{s1} , em que as partículas ainda estão localizadas no fundo do reator, mas nenhuma delas está em repouso (JOSSEN et al., 2018).

Para manter a fase sólida em suspensão, a força externa necessária pode ser proporcionada por agitação ou injeção de ar (JAFARI; CHAOUKI; TANGUY, 2012), sendo esta última inviável para cultivo de células animais, devido ao estresse que proporciona a formação e ruptura de bolhas (GARCIA-BRIONES; CHALMERS, 1994; KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990; PAPOUTSAKIS, 1991). Adicionalmente, para sistemas agitados, a magnitude do N_{s1} vai depender de vários parâmetros físicos, como a altura, posição e geometria do impelidor, geometria do reator, relação da

densidade da partícula e do líquido, e concentração de partículas (YOSHIDA et al., 2008).

Na literatura o primeiro estudo interessado em mostrar uma metodologia para determinar o N_{s1} em um sistema agitado, foi o apresentado por Zwietering (1957) para um sistema com defletores (chicanas). A metodologia baseada em técnicas visuais, utiliza um foco de luz e um instrumento ótico para avaliar a condição de suspensão das partículas através de vídeos ou imagens, considerando que a sedimentação das partículas na base do frasco tem que ser menor que dois segundos. Baseados nessa técnica, outros estudos têm sido realizados, permitindo obter várias correlações a partir da proposta por Zwietering (Equação 2) para reatores de tanque agitado usando diferentes tipos de impelidores, principalmente para processos de cristalização (ARMENANTE; NAGAMINE; SUSANTO, 1998). Nesse sentido, devido a que estas equações tem sido geradas principalmente para processos que envolvem partículas com altos diâmetros e densidades, podem não ser muito adequadas para prever o N_{s1} quando as partículas são pequenas e com densidades próximas às da fase líquida, como acontece em cultivo de células aderidas a microcarregadores, podendo gerar sobre estimações de até 40 por cento do valor real (IBRAHIM; NIENOW, 2004).

$$N_{s1} = S \frac{\nu^{0,1} d_p^{0,2} (g \Delta\rho / \rho_L)^{0,45} X^{0,13}}{D^{0,85}} \quad \text{Equação 2}$$

onde S é uma correlação específica de cada impelidor e dependente das dimensões dele e do tanque (adimensional), g é a constante gravitacional, d_p é o tamanho da partícula (m), $\Delta\rho$ e ρ_L é a diferença de densidades da partícula e do líquido e a densidade do líquido, respectivamente, (kg/m^3), ν é a viscosidade cinemática (m^2/s), X é a porcentagem de peso das partículas ($\text{g/g} \times 100$) e D o diâmetro do impelidor (m).

A falta de informação deste parâmetro para outros tipos de reatores em outras aplicações, somada a dificuldade intrínseca da metodologia proposta por Zwietering por ser subjetiva, têm gerado outras alternativas para a quantificação do

N_{s1} . Dessa forma, podem ser encontradas na literatura técnicas com medições pontuais ou em um plano 2D, intrusivas, com o uso de sensores, e não intrusivas, como a tomografia elétrica ou a densitometria de raios Gama (JAFARI; TANGUY; CHAOUKI, 2012), pouco usadas por temas de custos ou segurança (DELAFOSSE et al., 2018). Outras metodologias mais simples têm sido encontradas, como a do raio de cone constante (BRUCATO et al., 2010), ou a apresentada por Lawson e colaboradores que depende somente da retirada de amostras em pontos estratégicos do biorreator, até encontrar a condição na qual a concentração das partículas em cada um dos pontos seja próxima, garantindo uma dispersão mais homogênea da fase sólida (LAWSON et al., 2017).

Outra abordagem bastante interessante para prever a magnitude do N_{s1} , utiliza modelagem numérica por dinâmica de fluidos computacional (em inglês CFD). Envolvendo microcarregadores e biorreatores, foram encontrados na literatura estudos realizados usando modelos de Euler-Lagrange, caracterizado por considerar a fase sólida discreta (BERRY et al., 2016), e Euler-Euler, que assume a fase sólida como contínua (DELAFOSSE et al., 2018; KAISER et al., 2013; SCHIRMAIER et al., 2014). Apesar de ser uma ferramenta que pode ser muito útil, ainda não há simulações validadas, sendo necessário estudos mais aprofundados que levem a simulações precisas da relação da concentração e distribuição dos microcarregadores dentro do biorreator em uma determinada condição de agitação (DELAFOSSE et al., 2018).

Em cultivo de células aderentes, a concentração de microcarregadores pode variar, como observado na tabela 4, porém, concentrações menores que 20 g/L têm sido usadas devido ao efeito negativo causado no crescimento pela maior probabilidade de colisões entre os microcarregadores, podendo danificar as células aderidas na superfície (HEWITT et al., 2011; HU 1983 apud CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1988). Apesar da proximidade das densidades do meio e dos microcarregadores, com o aumento progressivo da quantidade de células crescendo na superfície dos microcarregadores, uma adequada velocidade de agitação será necessária para garantir a suspensão destes.

Tabela 4. Quantidades típicas usadas de diferentes microcarregadores em experimentos de cultivo com células aderentes.

| MICROCARREGADOR | CONCENTRAÇÃO (g/L) | TAMANHO (μm) | REFERÊNCIA |
|------------------------|-------------------------------|---|----------------------------------|
| Cytodex 3® | 5 | 140 - 210 | IBRAHIM; NIENOW, 2004 |
| Polystyrene | 1 | 160 - 212 | VENKAT; STOCK; CHALMERS, 1996 |
| Cytodex 1 | 3 | 60-87 | CROUGHAN; HAMEL; WANG, 2006 |
| Cytodex 3 | 4 | >175 | GREGORIADES et al., 2000 |
| Cytodex-1 | 1-5 | 60-87 | NG; BERRY; BUTLER, 1996 |
| Cultispher-G | 1,7-8.5 | 130-380 | |
| Cytodex-1 | 1,2 | 60-87 | FERRARI et al., 2012 |
| Cytodex-3 | 5 | 170–380 | YANG et al., 2010 |
| Cytodex1 e Cytodex 3 | 3 | 60-87 | SERRA et al., 2009 |
| Cultispher® S | 1-2 | 130-380 | EIBES et al., 2010 |
| ProNectin®F-COATED | 10 | 125-212 | JOSSSEN et al., 2018 |
| Collagen-coated | 15 | 125-212 | LAWSON et al., 2017 |

Neste sentido, o uso dos critérios N_{s1} e o N_{s1u} , nos estudos mais recentes de cultivo de células aderentes, tem mostrado que a manutenção deste parâmetro durante todo o cultivo pode favorecer a formação de grandes agregados, gerando problemas na quantificação e recuperação celular (HEWITT et al., 2011; JOSSEN et al., 2016; NIENOW et al., 2016; RAFIQ et al., 2013; SCHIRMAIER et al., 2014). Adicionalmente, o uso de baixas velocidades de agitação prejudicam a mistura e promovem uma maior exposição aos altos níveis de estresse por acumulação dos

microcarregadores nas regiões mais próximas da base do reator, especificamente embaixo do impelidor (BERRY et al., 2016). Desta forma, um incremento gradual e moderado na magnitude da velocidade de agitação será necessária para garantir a suspensão, evitar a agregação excessiva e danos às células aderidas aos microcarregadores devido ao movimento do fluido (IBRAHIM; NIENOW, 2004; LAWSON et al., 2017). O dano celular vem sendo produto da energia proporcionada pela agitação, transferida a uma série de turbilhões em cascata, com a energia suficiente para arrancar as células da superfície dos microcarregadores, sendo letais quando seu tamanho, η , calculado pela Equação 3, é menor que 2/3 do tamanho do microcarregador ou agregado (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1986).

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4}$$

Equação 3

onde η é a escala de turbilhões de Kolmogorov, ε é a energia de dissipação em unidades de m^2/s^3 e ν a viscosidade cinemática em m^2/s .

Esta equação proposta na década de 80, é baseada em correlações com dados experimentais, e ainda utilizada atualmente por explicar o dano celular causado pelas condições hidrodinâmicas em regime turbulento em sistemas agitados. Por este motivo, essa equação também foi de interesse neste trabalho.

2.5 TEMPO DE MISTURA (θ_m)

Outro parâmetro de interesse prático é o tempo de mistura (θ_m), considerado muito importante devido a informação que pode proporcionar a partir da eficiência de homogeneização e performance de um agitador (CABARET et al., 2007). As técnicas para a obtenção do tempo de mistura podem ser classificadas como intrusivas ou não intrusivas, descritas mais detalhadamente na Tabela 5. Nas intrusivas são usados sensores de temperatura, condutividade e pH, que podem ser

colocados em diferentes posições dentro do tanque. Por outro lado, nas técnicas não intrusivas encontram-se a tomografia de Resistência Elétrica (TRE), que permite produzir imagens da secção transversal através de medidas de condutividade e de algoritmos, para a produção de um tomograma a partir de medidas de diferença de potencial periférico; a técnica de Fluorescência Induzida por Laser Planar (pLIF, em inglês), que emprega uma folha de laser e um indicador fluorescente que absorve a energia de luz do laser e reemite um sinal luminoso que pode ser detectado por um fotodetector; e a técnica termográfica, na qual é usado um líquido termocromático que muda a cor em diferentes temperaturas. Algumas vantagens e desvantagens destas técnicas são apresentadas na Tabela 6 (ASCANIO, 2015; CABARET et al., 2007).

Tabela 5. Classificação de técnicas para a determinação do tempo de mistura (θ_m) em tanque agitado.

| PERTURBAÇÃO | | |
|--|--------------------|------------------------------------|
| NÃO INTRUSIVAS | INTRUSIVAS (SONDA) | |
| Colorimétrica | Condutometria | |
| Tomografia de resistência elétrica (ERT) | pH | |
| Rastreamento por emissão de partículas | Temperatura | |
| Termografia | | |
| Indução de fluorescência por laser | | |
| TIPO DE DADO PROPORCIONADO | | |
| MEDIÇÃO DIRETA | MEDIÇÃO INDIRETA | |
| Colorimétrica | Euler | Lagrange |
| Indução de fluorescência por laser | Termografia | Tomografia de resistência elétrica |
| Condutometria e pH | | |

Tabela 6. Vantagens e desvantagens de métodos para medição do tempo de mistura (θ_m) em tanque agitado.

| Tomografia de resistência elétrica (ERT) | | Indução de fluorescência por laser (pLIF) | |
|---|--|---|---|
| Vantagens | Desvantagens | Vantagens | Desvantagens |
| Não invasivo. | | Medida direta | A calibração deve ser feita antes das medidas. |
| Tomografias em 2D podem ser usadas para produzir campos de fluxo em 3D. | Custo elevado | Para fluxos reativos e não reativos | |
| Pode ser usado em condições aeradas ou sem ar. | A calibração deve ser feita antes das medidas. | Não invasivo. | Custo elevado (câmera e laser) |
| Permite observação de regiões de mistura isoladas. | Montagem demorada. | Visualização instantânea. | Para sistemas transparentes |
| Pode ser usado em sistemas transparentes ou não. | | Diferentes variáveis do processo podem ser obtidas (Temperatura, concentração, densidade) | Para fluídos semi-opacos com um laser especial. |
| | | Permite visualização em 2 D de regiões isoladas de mistura. | Não adequado para sistemas com alta aeração. |
| | | Para condições não aeradas ou com baixa aeração. | |

Continuação Tabela 6.

| Termografia | Sensores | | |
|--|--|--------------------------------------|--|
| Cristais líquidos exibem uma resposta rápida e reversível a mudanças de temperatura dinâmicas. | Usa sofisticados software para processamento das imagens. | Configuração acessível | Invasivo e intrusivo |
| Ampla faixa de temperaturas | Processamento de dados é demorado. | Implementação simples | Medida do tempo de mistura depende da posição do sensor |
| Não invasivo. | Usado para fluidos e tanques transparentes | Medida direta. | Requere calibração. |
| Configuração acessível. | Técnica invasiva. | Para fluidos transparentes e opacos. | Limitada resolução temporal e espacial. |
| Resolução espacial e temporal. | T tempo de mistura deve ser inferido a partir de dados Eulerianos. | Condições aeradas ou sem ar. | Sistema de medição para compensar mudanças de temperatura. |
| | Limitada aplicabilidade em condições de alta aeração. | | |

Fonte: Ascanio, (2015).

Entre as técnicas não intrusivas, a colorimétrica é uma das mais usadas, consistindo apenas da injeção de um indicador dentro de um tanque, que modifica a cor do fluido dependendo do pH. A técnica colorimétrica, além de permitir a obtenção do tempo de mistura de uma forma simples e com baixo custo, permite observar padrões de fluxo gerados em diferentes condições de agitação, facilitando a verificação da presença de fluxos secundários, como por exemplo, regiões bem misturadas ou zonas mortas. As principais vantagens e desvantagens desta técnica encontram-se descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Vantagens e desvantagens do método colorimétrico para determinação de θ_m .

| VANTAGENS | DESVANTAGENS |
|---|---|
| Medição direta | |
| Implementação simples | Medição subjetiva sem imagens |
| Técnica não invasiva | Resolução temporal com técnicas de imagens |
| Ausência de calibração | Resolução espacial com imagens de alta resolução |
| Revela estruturas do fluxo | |
| Pode ser usada em ausência ou presença de ar | Para sistemas transparentes somente |
| Precisa quando combinada com técnicas visuais | Limitada aplicabilidade em condições de alta aeração em regime turbulento |

Fonte: Ascanio, (2015).

A partir dos resultados experimentais no regime laminar e turbulento, foi observado que o θ_m é fortemente dependente dos parâmetros apresentados na Equação (4):

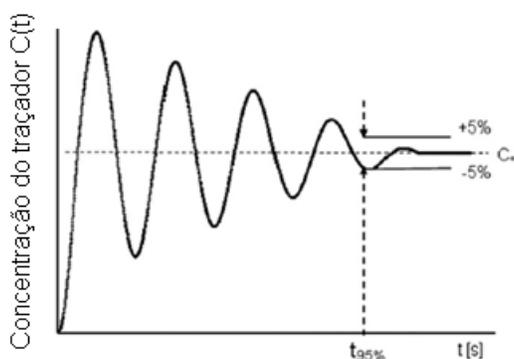
$$N\theta_m = f\left(\frac{D}{T}, \frac{N_Q}{N_p}, \frac{V_a}{V}, \frac{\Delta\rho}{\rho}\right)$$

Equação 4

sendo D o diâmetro do impelidor (m), T diâmetro do tanque (m), N_Q capacidade de bombeamento do impelidor, N_P o número de potência, V o volume do líquido (m^3), V_a volume do traçador injetado (m^3) e ρ densidade (kg/m^3).

Na determinação experimental do θ_m , pode ser encontrado na literatura o θ_{95} , definido como o tempo necessário para que uma concentração, $C(t)$, temperatura, $T(t)$, ou $pH(t)$, atinjam um valor com uma variação de $\pm 5\%$ do valor final (Figura 9), sendo uma aproximação bastante usada para sua determinação.

Figura 9. Típico perfil de concentração do traçador depois da adição no tanque agitado para determinação de θ_m .



Fonte: (TAN; EBERHARD; BÜCHS, 2011)

Desta forma, na literatura uma das correlações para determinar o θ_m mais conhecida é a proposta por Ruszkowski's em 1994, apresentada na Equação 5, aplicada para vários tipos e geometrias de impelidores e que considera a altura do líquido (H) = diâmetro do tanque (T):

$$\theta_m = A \left(\frac{1}{PN^{1/3}} \right) \left(\frac{1}{N} \right) \left(\frac{D}{T} \right)^{-2} \quad \text{Equação 5}$$

onde A é uma constante adimensional que depende do tipo do impelidor, P é a potência (W) e N o número de rotações (s^{-1}).

Desta equação em 1997 foi realizado um rearranjo por Nienow considerando A igual a 5,3, valor encontrado por Ruszkowski's, dando como resultado a Equação 6:

$$\theta_m = 5,91 \left(T^{\frac{2}{3}} \right) \left(\frac{\rho V}{P} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{T}{D} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Equação 6}$$

onde ρ a densidade do líquido ($\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$).

Outras correlações podem ser encontradas introduzindo termos para múltiplos impelidores (Equação 7), considerando parâmetros como a distância entre impelidores e eficiência do impelidor (MAGELLI et al., 2013), sendo necessário um estudo apropriado para casos diferentes.

$$\theta_m = A \left(T^{\frac{2}{3}} \right) \left(\frac{H}{D} \right)^{2,43} \left(\frac{V}{P} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{T}{D} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Equação 7}$$

Mesmo que o θ_m seja parâmetro pouco apropriado para ser considerado no escalonamento, o grau de homogeneidade é muito importante, razão pela qual a de sua quantificação é importante.

2.6 COMENTÁRIOS FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O uso de CEMs na terapia celular para o tratamento de várias doenças degenerativas e/ou autoimunes nos últimos 25 anos tem aumentado consideravelmente, levando a um grande interesse pela produção intensificada de células, que permita atender a alta demanda comercial gerada na terapia celular. Nesse sentido, métodos de expansão *in vitro* em sistemas estáticos têm sido amplamente estudados, evidenciando ao mesmo tempo os problemas dessa alternativa. Em contrapartida, os biorreatores, como o tradicional tanque agitado usado em várias aplicações industriais, são apresentados como uma alternativa, devido ao vasto conhecimento acumulado quanto a sua performance, escalonamento e operação.

Apesar do uso bastante difundido do tanque agitado, devido à complexidade inerente do processo de expansão de CEMs, algumas limitações

como o ambiente heterogêneo de forças hidrodinâmicas e as dificuldades com a formação de grandes agregados, impedem um eficiente processo de recuperação final, motivando o surgimento de outras configurações de biorreatores mais específicos para expansão de células aderentes para fins clínicos. A fim de preencher essa carência de biorreatores, nosso Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC), vem mostrando o potencial do biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT), como uma alternativa bastante promissora para o cultivo em larga escala de CEMs para fins terapêuticos.

Dessa forma, observando a carência de informação deste biorreator na área de cultivo celular, o presente trabalho torna-se relevante por contribuir com uma avaliação de parâmetros hidrodinâmicos considerados importantes, que permitiram verificar de forma objetiva o potencial de utilização do BEVT para o cultivo de CEMs com fins terapêuticos. Entre os parâmetros que já têm sido avaliados encontram-se o k_{La} e a tensão de cisalhamento (τ) em várias condições de agitação. Outros parâmetros relevantes e necessário são a velocidade mínima de suspensão de partículas (N_{s1}) e o tempo de mistura (θ_m). A obtenção destes parâmetros para caracterização e comparação com outros sistemas, torna-se indispensável além de permitir a otimização das condições mais interessantes para operar o BEVT, fazendo deste trabalho um estudo inédito, contribuindo com a área de bioprocessos de cultivos de CEMs primárias de grande interesse atual em aplicações terapêuticas.

3 OBJETIVOS

Avaliar o desempenho de um protótipo de biorreator com escoamento em vórtices de Taylor em escala laboratorial (200 mL) na expansão de CEMs primárias para uso clínico.

Como objetivos específicos:

1. Obter dados de velocidade mínima de suspensão (N_{s1}) do BEVT (200 mL), utilizando um microcarregador comercial de amplo uso na pesquisa e indústria, assim como o tempo de mistura (θ_m), ambas em várias velocidades de rotação.
2. Avaliar o desempenho do BEVT na expansão e modulação da agregação em cultivos com CEMs derivadas de cordão umbilical e tecido adiposo como modelo de células primárias, com a preservação das características funcionais importantes destas para fins clínicos, de acordo com as exigências dos órgãos reguladores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS

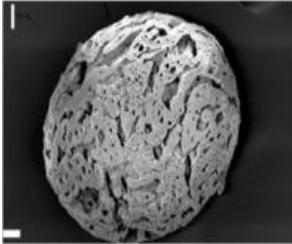
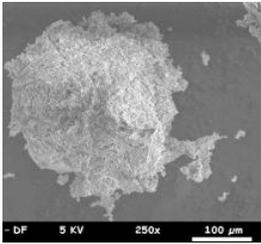
Nos experimentos de cultivo foram usados dois tipos de CEMs humanas: 1). Nos cultivos exploratórios preliminares, foi usada a linhagem conhecida como *human Mesenchymal Stem Cells-Telomerase Reverse Transcriptase (hMSC-TERT)*, imortalizada através da transfecção com o gene da transcriptase reversa da telomerase, proteína catalítica da subunidade do complexo da telomerase que impede o encurtamento dos telômeros após cada ciclo celular, gerando linhagens de células com a capacidade de expansão indefinida, mantendo sua taxa de crescimento fisiológico e as suas características funcionais (PIPER et al., 2012). A linhagem também possui a capacidade de expressão de GFP (Green Fluorescent Protein), proteína que apresenta fluorescência verde quando estimulada por luz ultravioleta, facilitando a visualização de células vivas quando utilizado o microscópio adequado. 2) Em cultivos de validação, foram usadas células primárias derivadas de cordão umbilical (CEMs-CU) e tecido adiposo (CEMs-AT), obtidas de um banco reservado no Hemocentro de Ribeirão Preto (HCRP nº 14906/2010), estabelecido no Laboratório de Terapia Celular, processo 920/2009, aprovado pelo comitê de ética.

4.2 MICROCARREGADORES

Foi utilizado o microcarregador Cultispher®S (PerCELL Biolytica, Suécia), caracterizado por possuir uma estrutura macroporosa, composta por uma matriz de gelatina, podendo ser dissolvido com uma enzima proteolítica, para auxiliar o processo de recuperação de células viáveis nos cultivos, evitando processos de filtração posteriores. Outro microcarregador utilizado, foi o fabricado em nosso grupo de pesquisa LATECC/UFSCar, e nomeado MAG (SUAZO, C. A.T; MOREIRA, F. M. A; WODEWOTZKY, T. I, 2016). Este é um microcarregador a base de alginato e gelatina, com densidade aparente similar à obtida para o Cultispher®S. O MAG também pode ser dissolvido com uma enzima proteolítica, apresentando uma

porcentagem de recuperação celular maior do que o Cultipher®S, como indicado em estudos prévios realizados em nosso laboratório. As características físicas de cada microcarregador são apresentadas na Tabela 8, a partir de informações fornecidas pelos fabricantes.

Tabela 8. Características do microcarregador Cultispher®S (PerCELL Biolytica, Suécia) e MAG usados nos cultivos para aderência das CEMs.

| CARACTERÍSTICAS | VALORES | |
|--|--|---|
| Densidade aparente (g/cm ³)* | 1,13 | 1,12 |
| Densidade de acordo ao fabricante (g/cm ³) | 1,04 | -- |
| Diâmetro (µm) | 130-380 | 250-355 |
| Número aproximado de microcarregadores/g de massa seca | 8,0x10 ⁵ | 6,0x10 ⁵ |
| Média do diâmetro de poro (µm) | 20 | 54,1 |
| Imagem do microcarregador** |  |  |

*Medida realizada no LATECC. ** Imagem obtida por YANG; ROSSI; PUTNINS, (2007) para o Cultispher®S (fotografia da esquerda) com barra de 20 µm e para o MAG (fotografia da direita) (SUAZO, C. A.T; MOREIRA, F. M. A; WODEWOTZKY, T. I., 2016) barra de 100 µm.

4.3 MEIOS DE CULTURA E CONGELAMENTO

O meio de cultura básico α -MEM (*Minimum Essential Medium*) (Cultilab, Brasil) foi utilizado para a expansão das CEMs, suplementado com 10-15% v/v de soro fetal bovino (SFB) (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, USA), antibiótico penicilina (10000 U/mL)/estreptomicina (10000 µg/mL) (Gibco, Life Technologies, USA), glicose (SIGMA-ALDRICH, EUA), glutamina (SIGMA-ALDRICH, EUA), arginina

(SIGMA-ALDRICH, EUA), hepes (SIGMA-ALDRICH, EUA) e bicarbonato de sódio (SIGMA-ALDRICH, EUA). Na Tabela 9 estão especificadas as quantidades presentes de cada componente, em relação a cada tipo de célula usada neste trabalho. Após a mistura dos componentes, o meio foi esterilizado por filtração em membranas estéreis de celulosa mista de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, EUA).

O meio de congelamento utilizado na criopreservação das CEMs, foi preparado com a composição de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% de Metil sulfóxido (DMSO 99,85 % extra puro, Across Organics, New Jersey, EUA), também esterilizado através do processo de filtração com membranas de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, EUA).

Tabela 9. Composição do meio de cultura α-MEM utilizado nos cultivos das CEMs.

| COMPONENTES | CEMs-CU/hMSC-TERT | CEMs-TA |
|-------------------------------------|---|---------|
| | QUANTIDADE | |
| Meio em pó α-MEM | 10 g | |
| Soro Fetal Bovino | 0,10-0,150 L | |
| Arginina | 0,43 g | --- |
| Glicose | 1.000 g | --- |
| Glutamina | 0,36 g | |
| Bicarbonato | 2,2 g | |
| Hepes (1M) | 2,6 g | |
| Penicilina e Streptomicina | 0,01 L | |
| Água purificada tipo 1 (no Milli-Q) | Suficiente SUAZO, C. A.T; MOREIRA, F. M. A; WODEWOTZKY, T. I para completar 1 L | |

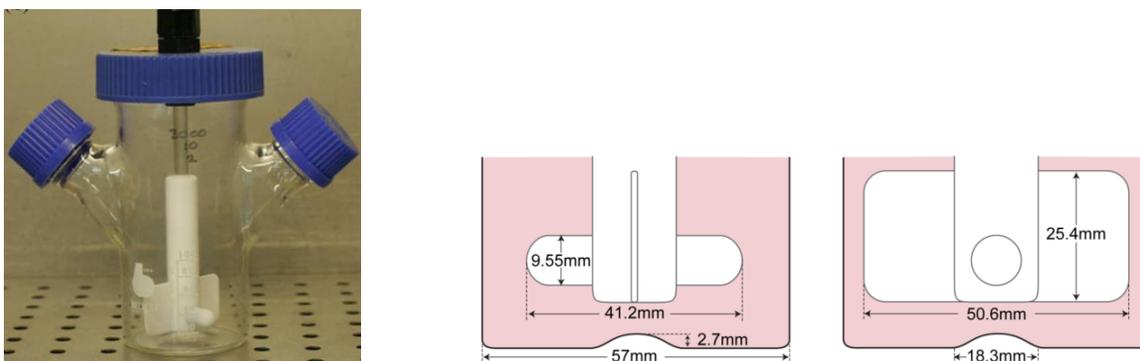
4.4 PREPARO DE INÓCULO

O preparo do inóculo para os cultivos nos biorreatores foi realizado com a expansão das CEMs em cultura estática, em frascos T de 75 e 150 cm², com superfícies tratadas para adesão (Kasvi, Brasil). Os frascos foram mantidos em uma incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Todos os procedimentos envolvendo manipulação asséptica foram realizados na Câmara de biossegurança Sterilgard III advance, classe II modelo SG403/SG603 (Baker Company, Maine, EUA).

4.5 FRASCO SPINNER

Cultivos para fins comparativos foram realizados utilizando o frasco *Spinner* de 100 mL (Bellco, New Jersey, EUA), com agitador magnético horizontal e pás verticais de Teflon, como apresentado na Figura 10.

Figura 10. Ilustração do frasco *Spinner* e dimensões do impelidor.



Fonte: Ismadi; Hourigan; Fouras (2014).

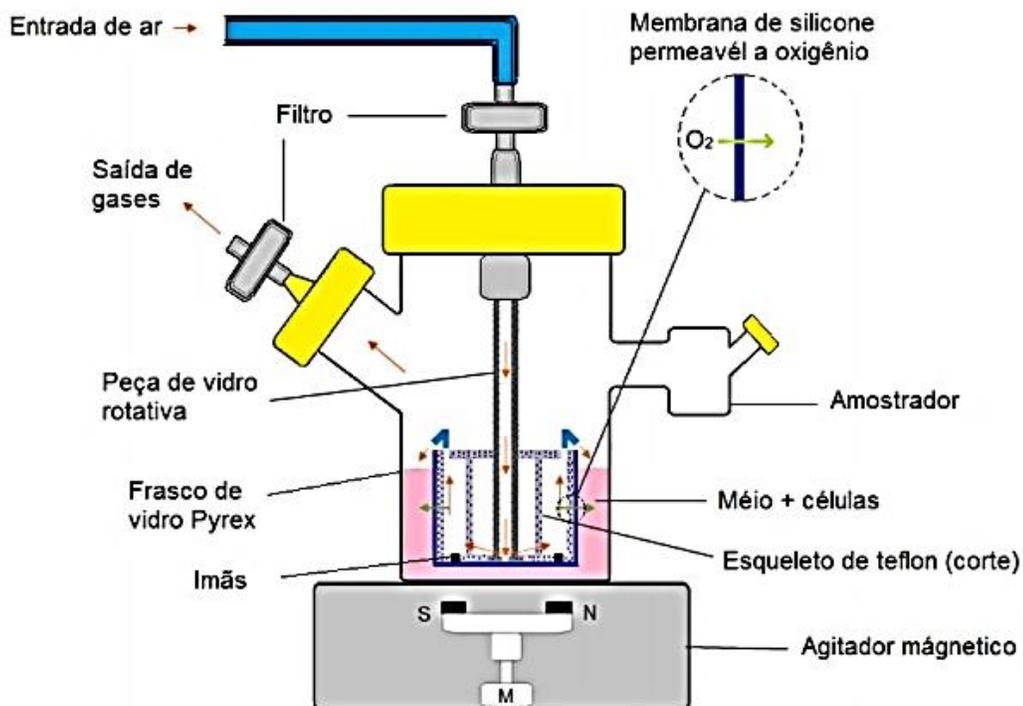
4.6 BIORREATOR DE ESCOAMENTO EM VÓRTICES DE TAYLOR (BEVT)

O laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC) vem estudando a performance do BEVT para aplicação em cultivo de células animais aderentes há mais de 10 anos. Desta forma, o primeiro estudo realizado com o BEVT, construindo de aço inox e volume de trabalho de 800 mL, gerou uma patente (SUAZO, GIORDANO; SANTIAGO, 2010) e um dos trabalhos pioneiros no uso deste

biorreator para o cultivo de células CHO-K1 na produção de uma proteína recombinante (SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011).

Nos estudos seguintes, um protótipo menor do BEVT, com volume de 100 mL, foi construído apresentando um corpo de vidro borossilicato e dois braços laterais com tampas de teflon (PFTE), com o propósito de facilitar a retirada de amostras e a saída/entrada de gases, como dióxido de carbono, nitrogênio e ar, passando previamente por um filtro; a tampa superior também de PFTE, está conectada a um filtro para saída/entrada de gases; o cilindro interno possui o esqueleto construído de PFTE, recoberto por uma membrana fina de silicone, e suspenso por uma haste de vidro que permitir o giro deste (Figura 11 e 12d).

Figura 11. Desenho do BEVT e seus componentes principais.

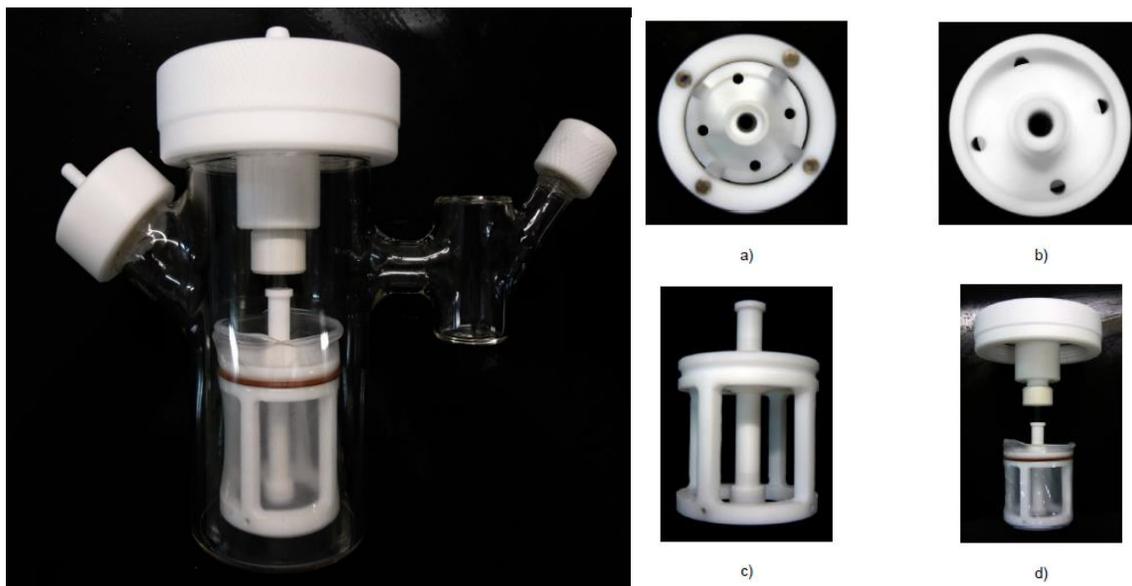


Fonte: Acervo pessoal

A parte superior do agitador (Figura 12c) possui quatro furos (Figura 12b), para saída bem distribuída dos gases. Na parte inferior do esqueleto do agitador,

há fixados seis ímãs distribuídos simetricamente para possibilitar a rotação do cilindro interno (Figura 12a), quando colocado sobre um agitador magnético. Neste novo protótipo do BEVT, a membrana de silicone (Momentive Performance Materials, New York, EUA), que rodeia o cilindro interno e evita a formação de bolhas de ar no meio de cultivo, também foi redesenhada para ser mais fina. Usando este protótipo do BEVT um novo estudo foi completado por Gil, (2013), avaliando a capacidade de oxigenação e tensões de cisalhamento medias, a velocidades de rotação maiores às usadas no estudo de Santiago e colaboradores.

Figura 12. Protótipo do BEVT utilizado nos experimentos de cultivo de CEMs, com o agitador (cilindro interno) e membrana de silicone. a) Base, b) parte superior, c) visão lateral do cilindro interno e d) a tampa superior unida ao cilindro interno através da haste de vidro.



Posteriormente, foi construído outro BEVT, conservando a mesma relação entre o raio interno e externo, para suportar um volume do meio de cultivo de 200 mL e foi usado também neste trabalho. Desta forma, no presente estudo foram utilizados dois BEVTs com volumes de 100 e 200 mL. As informações detalhadas das dimensões dos BEVTs podem ser encontradas na Tabela 10.

Tabela 10. Dimensões e características geométricas dos BEVT utilizados neste trabalho.

| Características | BEVT 1 | BEVT 2 |
|--|---------|---------|
| Raio externo do biorreator R_{ext} (Raio do vaso de vidro) | 32,6 mm | 32,6 mm |
| Raio interno do biorreator R_{int} (Raio do impelidor + espessura da membrana de silicone) | 21,9 mm | 21,9 mm |
| Altura do agitador | 50,8 mm | 50,8 mm |
| Altura do líquido H | 40 mm | 70 mm |
| Espessura da membrana de silicone | 0,22 mm | 0,22 mm |
| Espaço anular ($d = R_{ext} - R_{int}$) | 10,7 mm | 10,7 mm |
| Volume do biorreator | 100 mL | 200 mL |
| Volume de trabalho | 60 mL | 100 mL |
| Razão entre os raios, $\sigma = R_{int}/R_{ext}$ | 0,67 | 0,67 |
| Razão de aspecto, $\Gamma = H/d$ | 3,74 | 6,56 |

As duas configurações do BEVT usadas na realização das medidas hidrodinâmicas e nos cultivos, estão as apresentadas na Figura 13, em A) um cilindro interno deformado, que apresenta uma forma semelhante a um prisma reto de base quadrada. Esse efeito ocorre devido à espessura da membrana de silicone, que promoveu a modificação da forma cilíndrica, fazendo com que o líquido ocupasse um espaço adicional, finalmente, influenciando na altura do líquido entre os dois cilindros (Figura 13A e 13B). Na Figura 13C, a configuração do cilindro interno, totalmente redonda, foi preservada. A variação da forma do cilindro interno influenciou na altura do líquido aumentado de 6,5 cm a 8 cm, para o cilindro interno deformado e redondo, respectivamente, e conseqüentemente no número de vórtices, afetando os parâmetros hidrodinâmicos estudados. Em vista disso, para verificar quantitativamente a magnitude desta influência, optou-se por comparar ambas geometrias considerando as dimensões apresentadas na Figura 14.

Figura 13. Configurações do BEVT usadas com: (A) cilindro interno deformado; (B) Altura do líquido com o cilindro interno deformado; (C) Altura do cilindro interno redondo.

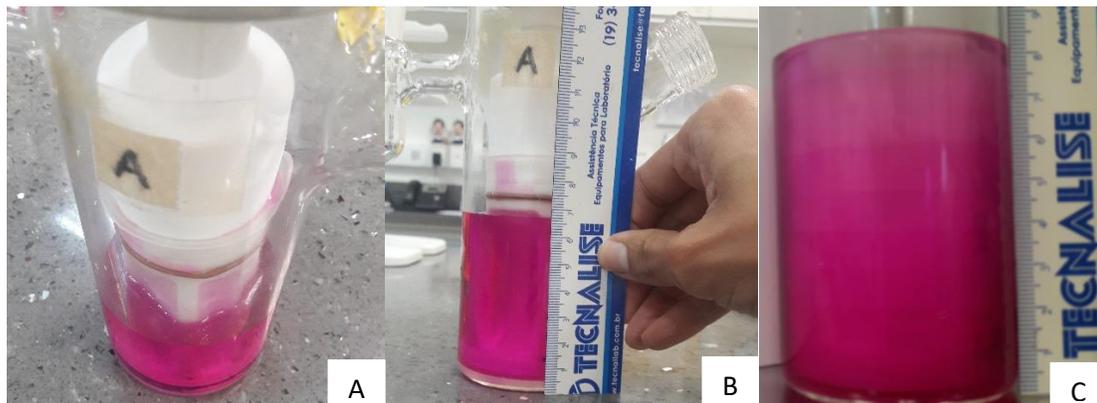
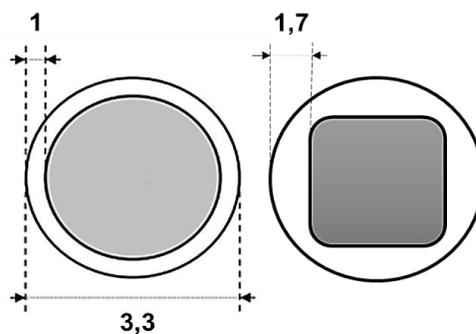


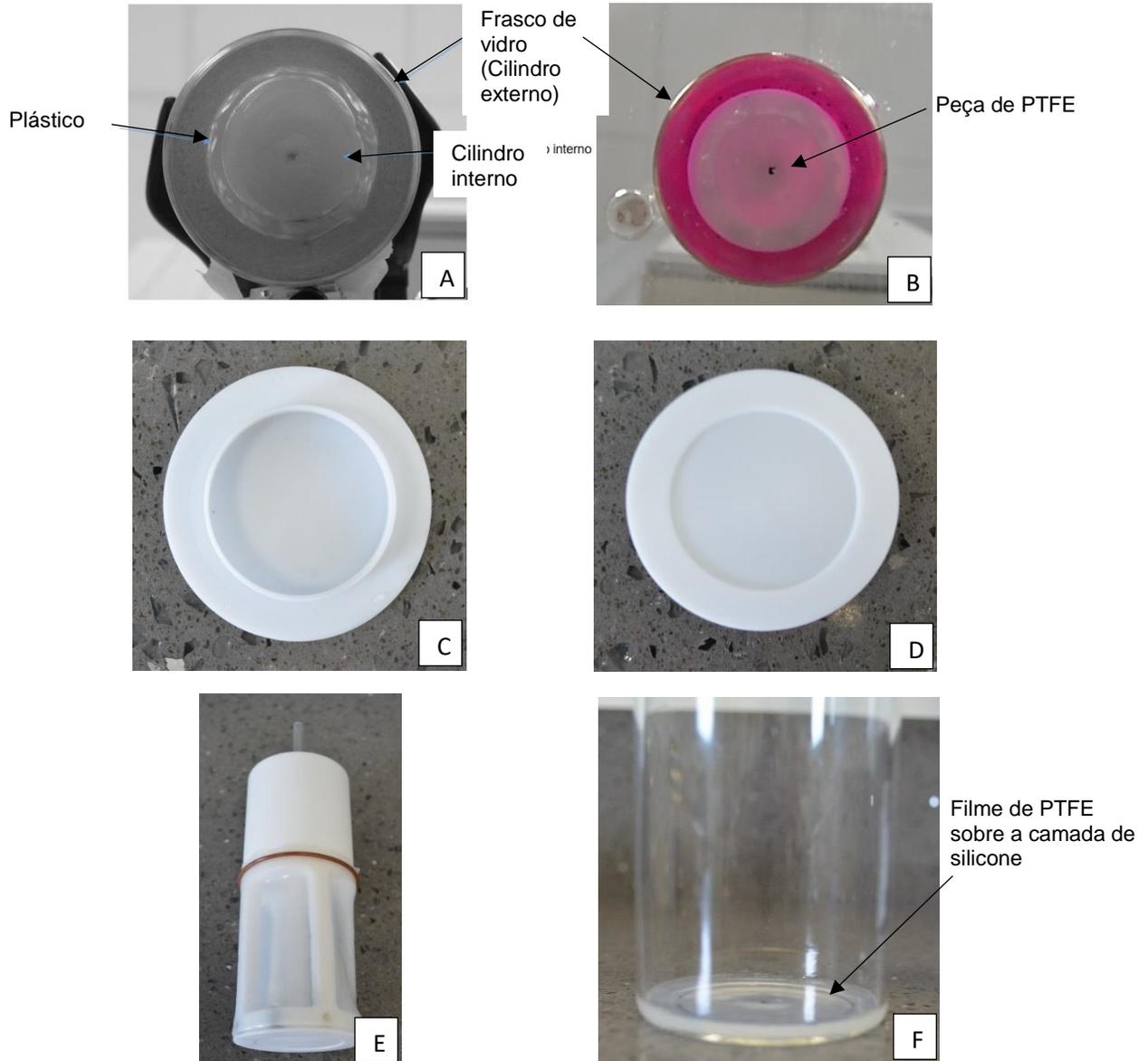
Figura 14. Esquema dos BEVT com o cilindro interno redondo (esquerda) e o deformado em forma de prisma reto de base quadrada (direita) usados neste trabalho, dimensões dadas em cm.



Fonte: acervo pessoal

Posteriormente, na realização das medidas de velocidade mínima de suspensão (N_{s1}) foi necessária uma peça de PTFE na base do cilindro interno (Figura 15C e 15D), para facilitar um contato mais próximo com a base do biorreator (Figura 15A e 15B), além disso, a base do BEVT precisou ser modificada para apresentar uma superfície o mais plana possível (Figura 15F), através de camada fina de silicone sobre a qual foi colocada uma lâmina circular também de PTFE, diminuindo o atrito entre a base do BEVT e a nova peça colocada na base do cilindro interno.

Figura 15. Modificação realizada no BEVT. Em (A) o cilindro interno recoberto com um filme plástico (poliéster) até o fundo do biorreator para determinação do N_{s1} . Modificação final do BEVT para os processos posteriores (B), com peça de PTFE encaixada na parte inferior do cilindro interno (C) e (D). Vista completa do cilindro interno com membrana e a nova peça de PTFE (E). Base do frasco de vidro com camada de silicone e filme de PTFE (F).



4.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HIDRODINÂMICOS NO BEVT

4.7.1 Medição da velocidade mínima de suspensão (N_{s1}) no BEVT

As medidas de velocidade de agitação para completa suspensão de partículas, N_{s1} , foram realizadas no BEVT com as duas geometrias de cilindro interno, deformado e redondo, e um volume de trabalho de 100 mL, através da técnica proposta por Zwietering (1958). Para isto, o biorreator foi inoculado com uma suspensão de microcarregadores Cultispher®S tratados (seguindo as instruções do fabricante para uso em cultivo), em uma solução de PBS (Tabela 11) com volume igual ao usado em cultivo (100 mL). Para cada concentração de partículas, foram usadas várias frequências de rotação, até obter a condição na qual as partículas se mantiveram sedimentadas na base do biorreator por apenas um tempo de um a dois segundos. Com o fim de evitar distorções na visualização dos microcarregadores, por causa da curvatura do tanque, o frasco foi colocado dentro de um vaso quadrado contendo água. O movimento das partículas em diferentes condições foi observado cuidadosamente com uma fonte de luz, localizada embaixo de uma plataforma de vidro sobre a qual era colocado o biorreator. As medidas foram filmadas, com uma câmera profissional (Nikon D5200, Tóquio, Japão), após 20 minutos da ativação da rotação do cilindro interno.

Tabela 11. Composição da solução de PBS usada durante os experimentos.

| COMPONENTE | QUANTIDADE |
|------------------------------------|------------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| NaHPO ₄ | 1,15 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,2 g |
| Água purificada tipo 1 (no Mili-Q) | 1 L |

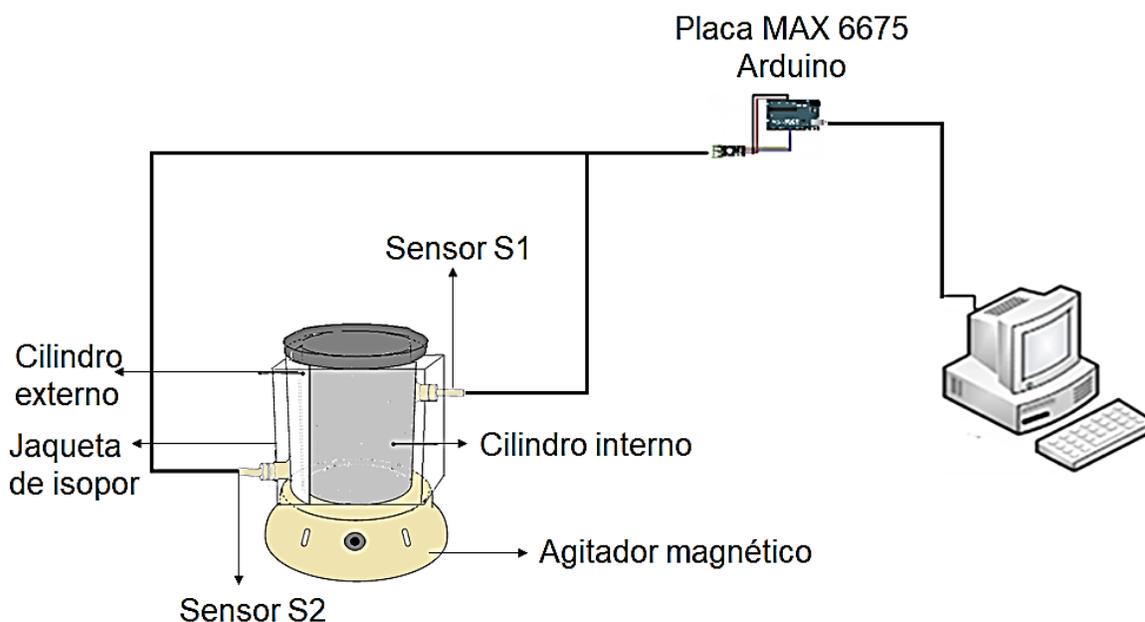
A metodologia proposta por Lawson e colaboradores (2017) foi também usada, para verificação dos resultados obtidos visualmente, através da retirada de amostras na parte superior e inferior do BEVT. Dessa forma, para verificar a concentração de microcarregadores em cada posição e condição de rotação testada, estes foram colocados em um filtro e levados a uma estufa a 60 °C durante 24 h, para ser posteriormente pesados. As medidas foram realizadas em triplicata para concentrações de partículas variando de 1 a 5 g/L. Uma curva para verificação do tempo necessário para secagem de uma amostra foi realizada em triplicata previamente.

4.7.2 Medição do tempo de mistura (θ_m) no BEVT

O tempo de mistura no BEVT, com as duas geometrias de cilindro interno, foi avaliado usando sensores de temperatura tipo K, um módulo de leitura Max6675 (Arduino, Ivrea, Itália), uma placa Arduino e o programa Arduino 1.8.5 (o código usado está exibido no apêndice). Nas medidas, o cilindro interno redondo e deformado, foram colocados dentro de um frasco de alumínio, atuando como cilindro externo com um filme fino de teflon na base para diminuir o atrito entre estes e permitir o giro contínuo do cilindro interno. O frasco de alumínio permaneceu isolado do ambiente, através de uma camada de aproximadamente 2,7 cm de isopor. Nas paredes deste, em direções opostas, os sensores de temperatura foram posicionados, localizados uno a 0,5 cm da superfície do líquido, e o outro a 0,5 cm da base do frasco (Figura 16). Desta forma, para determinar a influência do volume do indicador na medida, foi usada a técnica de pulso com quantidades, neste caso de água quente (~80 °C), entre de 1, 2, 3 e 5 % de volume, em um volume de água a temperatura ambiente (20-22 °C) encontrado dentro do biorreator, adicionados a ~1 cm da superfície da água. A velocidade de rotação usada para este teste foi de 120 rpm. A partir destes resultados foi escolhido o volume ótimo para a quantificação do θ_m em frequências de rotação de 50, 70 e 100 rpm, realizados em triplicata. Os dados de temperatura coletados pelos sensores foram obtidos a cada ~270 milissegundos, considerando o início e fim das medidas até atingir uma tendência estável da variável de resposta (θ_m). O tempo de resposta dos sensores,

definido como o tempo onde o sinal atinge 63,2% do seu valor máximo, foi avaliado através de um ensaio em degrau, deixando o eletrodo em água à temperatura ambiente até que este indicasse uma leitura estável e, em seguida, sendo introduzido em água quente (~70 °C). Esta medida foi realizada também em triplicata.

Figura 16. Esquema de obtenção de dados através dos sensores de temperatura tipo K, para determinação do tempo de mistura a frequências de rotação entre 50 e 120 rpm no BEVT.



Fonte: Acervo pessoal

Outra técnica usada para a verificação dos valores encontrados do θ_m através do método térmico, foi a de descoloração por mudança de pH, através da adição de um ácido ou uma base forte em água (100 mL) a temperatura ambiente, contendo um indicador, neste caso, 0.01 g/L de fenolftaleína. Inicialmente, o biorreator foi mantido em repouso até a adição de 40 μ L de NaOH (10 M), em seguida a agitação e a contagem de tempo foram ativadas até a visualização de uma cor fúcsia homogênea, isto para cada condição de rotação testada. As medidas foram filmadas com uma câmera fotográfica profissional (Nikon D5200, Tóquio, Japão) e realizadas em triplicata. Para evitar mudanças de viscosidade, a cada

experimento a solução de água foi trocada. Essa técnica também permitiu a visualização dos vórtices e a verificação de zonas segregadas devido à geometria do biorreator (LAMBERTO et al., 1996). O movimento do fluido em três geometrias do cilindro interno, redonda, quadrada e deformada, também foi observado através do uso de um fluido reoscópico. Desta forma, o BEVT foi levado para um quarto escuro, e com ajuda de uma fonte de luz de 5 W, vídeos foram coletados com uma câmera fotográfica profissional (Nikon D5200, Tóquio, Japão), para frequência de rotação de 50 e 120 rpm com cada configuração.

4.7.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)

A determinação dos coeficientes de transferência de oxigênio ($k_L a$) para cada condição de agitação utilizada nos cultivos com os BEVTs (volume de trabalho de 60 e 100 mL), foram determinados usando a técnica dinâmica de absorção de oxigênio, empregada em um estudo prévio apresentado por Gonzalez (2015). Para estas medidas foi usada uma sonda (InPro®6800 Series O2 sensor 12/25 mm da Mettler, Toledo), imersa no meio de cultura, conectada ao BioFlo 110 Modular Benchtop Fermentor M1273-0054 (New Brunswick Scientific, Nova Jersey, EUA). Desta forma, os $k_L a$ s, sendo o coeficiente angular, foram obtidos através da integração da equação de balanço de massa (Eq. 8) e os dados coletados da variação da concentração de oxigênio com o tempo.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_G - C_L) \quad \text{Equação 8}$$

onde, C_G é a concentração de oxigênio na fase gasosa, C_L a concentração de oxigênio no seio do líquido, k_L o coeficiente global de transferência de massa e a é a área interfacial.

4.7.4 Cálculo da tensão de cisalhamento no BEVT

As tensões de cisalhamento médias foram calculadas com relações empíricas encontradas na literatura, considerando a geometria do BEVT. Desta

forma, variáveis como o torque produzido pelo movimento do cilindro interno, o número adimensional do torque (Eq. 9 e 10), a energia de dissipação e a frequência de rotação do cilindro interno, foram empregadas. O número adimensional do torque foi calculado baseado na correlação proposta por Wendt em 1933 *apud* Lathrop; Fineberg; Swinney, (1992):

$$G = 1,45 \frac{\sigma^{3/2}}{(1-\sigma)^{7/4}} Re^{3/2} \quad \text{para } 4 \times 10^2 < Re < 10^4 \quad \text{Equação 9}$$

$$G = 0,23 \frac{\sigma^{3/2}}{(1-\sigma)^{7/4}} Re^{1,7} \quad \text{para } 10^4 < Re < 10^5 \quad \text{Equação 10}$$

onde σ é a relação entre raios e Re é o número de Reynolds.

A partir destas relações foi calculado o torque (Eq. 11) e, conseqüentemente, a energia de dissipação por segundo por unidade de volume (Eq. 12) (RACINA; KIND, 2006), sendo esta última variável dependente da taxa de cisalhamento (Eq. 13) (SÁNCHEZ PÉREZ et al., 2006), que permite estimar finalmente o valor da tensão de cisalhamento média no espaço anular (Eq. 14):

$$T = G * \rho * v^2 * h \quad \text{Equação 11}$$

$$\varepsilon = \frac{T * \Omega}{\rho * V} \quad \text{Equação 12}$$

$$\gamma = \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 13}$$

$$\tau = \gamma * \mu \quad \text{Equação 14}$$

onde, ε é a energia de dissipação média ($W \cdot kg^{-1}$), γ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}), τ é a tensão de cisalhamento ($N \cdot m^{-2}$), h a altura do líquido (m), Ω é a frequência de rotação do cilindro interno (s^{-1}), ν é a viscosidade cinemática ($m^2 \cdot s^{-1}$) e ρ a densidade do líquido ($kg \cdot m^3$).

4.8 PROCEDIMENTO PADRÃO SEGUIDO NOS EXPERIMENTOS DE CULTIVO DAS CEMS NO BEVT E NO FRASCO *SPINNER*

4.8.1 Ativação das células

CEMs mantidas em tubos criogênicos submersos em nitrogênio líquido a -196°C, foram retiradas e descongeladas em um banho termostático a 37 °C. Após o descongelamento completo, as CEMs foram transferidas para um tubo *Falcon* contendo 9 mL de meio de cultivo α -MEM (suplementado de acordo com a Tabela 9), para posterior centrifugação (Excelsa Baby I, modelo 206, FANEM, Brasil) a 400 g por 5 minutos. Em seguida, após a retirada do sobrenadante, as CEMs foram ressuspensas em 2 mL de meio e inoculadas nos frascos T contendo uma quantidade de meio de cultura tal que o volume final completou 15 mL, para frascos T de 75 cm², ou 30 mL, para frascos T de 150 cm². A concentração de células inoculada foi conhecida por contagem prévia no hemocitômetro, usando o método de coloração com solução aquosa de azul de tripan 0,4% v/v (GIBCO, Massachusetts, EUA). Após a inoculação das células, os frascos T foram levados a uma incubadora (Thermo Forma Series II Water Jacket CO₂ Incubator, Massachusetts, EUA), para manter condições estáveis de 37°C e 5% de CO₂.

4.8.2 Preparação para inoculação no BEVT e frasco *Spinner*

Após atingir uma confluência celular de 80-90 % nos frascos T, as CEMs foram lavadas com 10 mL de PBS (Tabela 11) para a retirada resíduos de células mortas e MEC. Em seguida, um volume de 4 ou 8 mL na garrafa de 75 ou 150 cm², respectivamente, da enzima de dissociação TrypLE[®]Select (1X) (GIBCO, Massachusetts, EUA), foi adicionado e mantido por 5 minutos a 37 °C, para facilitar a quebra das uniões entre as células e destas com a superfície dos frascos. A ação enzimática foi atenuada pela adição de meio de cultivo, de 6 ou 12 mL para frascos de 75 e 150 cm², respectivamente. Esta solução foi transferida para um tubo *Falcon* e posteriormente centrifugada a 400 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 3 mL de meio de cultura. Desta suspensão foi

retirada uma alíquota de 0,5 mL para contagem no hemocitômetro, que permitiu definir a quantidade de CEMs a ser inoculada no biorreator.

Antes do cultivo, os microcarregadores foram preparados segundo as especificações do fabricante. Para isso, uma concentração de Cultispher®S foi suspensa em PBS durante aproximadamente uma hora para posterior esterilização a 120°C durante 30 minutos. Em seguida os microcarregadores foram lavados duas vezes com PBS estéril e, finalmente, deixados em meio de cultivo na geladeira até a inoculação no biorreator.

Para os microcarregadores MAG, um procedimento de hidratação diferente foi necessário. Para isto, a quantidade desejada de microcarregadores MAG foi deixada durante 4 horas em uma solução de reticulação, contendo 50 mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich, EUA), 1 % de CaCl₂ (Sigma-Aldrich, EUA), 5 mM de N-hydroxysuccinimide (NHS) (Sigma-Aldrich, EUA) e 50 mM do tampão MES (Sigma-Aldrich, EUA), para posterior lavagem e esterilização em soro fisiológico a 120°C durante 30 minutos. Após o procedimento, eles foram ressuspensos em meio de cultivo até a inoculação no biorreator.

Na preparação do BEVT e frasco *Spinner*, uma pasta heptanólica de organosiloxano clorado, nomeada comercialmente como Sigmacote® (Sigma-Aldrich, EUA), foi aplicada nas paredes internas, permitindo a formação de uma fina camada para evitar a adesão de células e microcarregadores no vidro. Após alguns minutos, necessários para a evaporação completa do heptano à temperatura ambiente, os biorreatores foram lavados com água destilada, secados em uma estufa e finalmente esterilizados a 120 °C por 30 minutos.

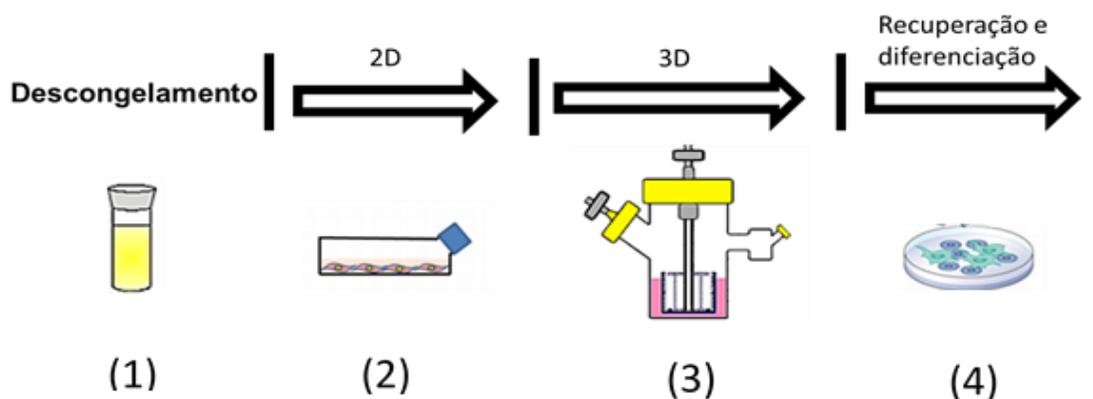
4.8.3 Cultivo no BEVT

Inicialmente, o BEVT, com volume de trabalho de 60 e 100 mL, foi inoculado com o meio de cultura α -MEM e com os microcarregadores hidratados, em seguida, as CEMs foram inoculadas na relação de 50, 30 ou 20 células/microcarregador dependendo do experimento, e o volume necessário em cada caso foi completando com meio. Em seguida, o BEVT foi levado à incubadora para iniciar a fase de

adesão com duração total de 8 h. Esta etapa foi dividida em 4 partes, cada uma com tempo de duração de duas horas, iniciando nas primeiras duas horas, com agitado por 1 minuto a cada 15 minutos, nas seguintes duas horas a cada 30 minutos, as próximas duas horas agitação a cada 60 minutos, e nas últimas duas horas, sem agitação. A intermitência foi necessária para maximizar a adesão e distribuição homogênea das células nos microcarregadores (NG; BERRY; BUTLER, 1996).

Trocas de meio foram realizadas a cada 24h, para os experimentos preliminares, e as 96 e 144 ou 168 horas, nos experimentos de validação, isto para evitar a depleção de nutrientes e diluição de metabólitos tóxicos. O pH foi controlado através da manipulação da porcentagem de CO₂ na incubadora Thermo Forma Direct Heat CO₂ incubator (Massachusetts, EUA). Os experimentos foram realizados sem injeção de ar forçada através do biorreator. Na Figura 17 é representado o procedimento que foi seguido para a execução dos experimentos de cultivo no BEVT.

Figura 17. Procedimento seguido na realização de um experimento de cultivo no BEVT. As etapas são: 1) Descongelamento e ativação celular; 2) Cultivo em 2D para preparação do inóculo no BEVT; 3) Expansão em 3D no BEVT e 4) Recuperação e diferenciação celular depois do cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

4.8.4 Cultivos em frasco *Spinner*

O frasco *Spinner* usado nos cultivos (100 mL), consiste em um frasco de vidro contendo um agitador de teflon de barra e duas pás verticais (BellCo, New Jersey, USA). Neste biorreator, os procedimentos de inoculação, fase de adesão e fase de expansão, foram executadas seguindo o mesmo protocolo empregado no BEVT. A agitação utilizada nas fases adesão e expansão foi de 30 rpm, a mínima para suspensão dos microcarregadores (N_{s1}) (HEWITT et al., 2011).

4.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

Após a fase de adesão e a cada 24 horas, uma amostra foi retirada dos biorreatores e separada para avaliação da densidade das células aderidas e em suspensão; quantificação do consumo de nutrientes e da produção de metabólitos tóxicos (lactato e amônia); quantificação da morte celular e do tamanho médio de agregados, através dos procedimentos descritos a seguir.

4.9.1 Análise de viabilidade e densidade celular

A quantificação diária, das células aderidas aos microcarregadores e as encontradas na suspensão, foi realizada usando uma mistura das enzimas Colagenase tipo I e TrypLE®Select (1X) ou somente TrypLE®Select (1X) (GIBCO, Massachusetts, EUA), durante ~7 minutos a 37 °C com agitação manual da amostra nos últimos 2 minutos. Para o processo de recuperação celular final, foi utilizada a enzima TrypLE®Select (10X) (GIBCO, Massachusetts, EUA) durante 15 a 20 minutos acompanhado de agitação mecânica constante. Após observar a degradação dos microcarregadores, as amostras foram centrifugadas para a posterior retirada do sobrenadante, e em seguida, as células foram ressuspensas em meio de cultivo. A determinação da densidade e a viabilidade celular foi realizada pelo método de coloração com solução aquosa de azul de tripan 0,4% v/v (GIBCO, Massachusetts, EUA). A contagem foi realizada com uma câmara de Neubauer (hemacitômetro, LO-Laboroptik, Lancing, Inglaterra) e um microscópio BX51 (Olympus, Japão). O corante permitiu a contagem diferencial de células vivas

e mortas (NG; BERRY; BUTLER, 1996), sendo estas últimas permeáveis ao corante adquirindo uma cor azulada. A média e o desvio padrão das medidas de densidade e viabilidade celular foram determinados considerando entre 4 e 8 eventos de contagem, sendo cada evento representado pela contagem de oito quadrantes, utilizando o software Microsoft Excel 2010.

A densidade celular foi também quantificada usando o método do MTT com o kit toxicológico *in vitro* (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), fundamentado na reação enzimática, na qual é reduzido o Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (amarelo) para formazan (azul escuro). A quantificação do número de células foi realizada a partir da medida de atividade mitocondrial das células viáveis. Assim, ao início do experimento, uma amostra de células foi usada para a elaboração de uma curva de calibração, obtendo uma relação de valores de absorbância contra concentrações de células. Os dados de absorbância foram obtidos no comprimento de onda de 590 nm utilizando um espectrofotômetro Multiskan FC 2,5 (Thermo Forma, EUA).

4.9.2 Quantificação da morte celular

Durante os experimentos também foi quantificada a morte celular através da atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH) usando o kit toxicológico *in vitro* (Sigma Aldrich, Missouri, USA). Desta forma, da amostra retirada diariamente, 300 µL do sobrenadante foram separados e realizado o protocolo indicado pelo fabricante.

4.9.3 Análise de glicose, lactato, aminoácidos e amônia

O bioanalizador YSI-7100 MBS (Multiparameter Bionanalytical System, Yellow Springs Instruments, EUA) foi utilizado para a quantificação da concentração de glicose, e lactato. 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 a

concentração do substrato definida. A análise de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizou uma coluna pico-tag (Waters, IRL) como fase estacionária e como eluente foi utilizado um gradiente constituído por duas fases móveis A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado 17,86 g/L (J. T. Baker, EUA), trietilamina 0,047 % v/v (Sigma-Aldrich, EUA), EDTA 0,0188 % v/v e acetonitrila 6 % v/v (Panreac, ESP) em água ultrapura tipo 1. A fase B, apenas acetonitrila 60% v/v e EDTA 0,02% v/v em água ultrapura tipo 1. As condições de operação do cromatógrafo da Waters foram: temperatura de 36°C, tempo de corrida de 45 minutos e gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm. Por outro lado, as análises da concentração de amônia foram feitas com eletrodo íon seletivo. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A, foi utilizado para obter as medidas de milivoltagem.

4.9.4 Medição do tamanho de agregados durante o cultivo

Dentre as amostras retiradas a cada 24 horas, uma quantidade de microcarregadores foi corada com 20 µL de solução aquosa de cristal violeta (GIBCO, Massachusetts, EUA). Os microcarregadores foram lavados com água destilada e transferidos para a câmara de Neubauer (hemacitômetro, LO-Laboroptik, Lancing, Inglaterra). Os microcarregadores corados foram fotografados com ajuda de um microscópio modelo CK30 (Olympus, Japão) e uma câmera fotográfica (Nikon D5200, Tóquio, Japão). As imagens adquiridas foram tratadas com o software Imagem Pro Plus 8.5, para medição do diâmetro médio de uma população de 50 a 100 agregados.

4.9.5 Fixação de células para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A verificação das células aderidas aos microcarregadores e formação de agregados durante o cultivo também foi evidenciada através de microscopia

eletrônica de varredura (MEV). O tratamento das amostras foi iniciado com a lavagem dos microcarregadores/agregados com PBS a 37°C, colocados previamente em uma placa de 24 poços. Em seguida, as células foram fixadas com uma solução contendo 2% (v/v) de glutaraldeído 50 % (Anidrol, Brasil), 0,1 M de cacodilato de Na⁺ (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 0,1 M de sacarose (Labsynth, Brasil), a 4°C por 12 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas exaustivamente (aproximadamente 6 vezes) com uma solução de 0,1 M de cacodilato de Na⁺ (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Em seguida, 2 mL de uma solução de 1% de tetraóxido de Ósmio (Thermo Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e 0,1 M de cacodilato de sódio, foi adicionada a cada poço e deixada por 1 hora. Após esse período, esta solução foi substituída por uma solução contendo 1% (v/v) de ácido tânico (Neon comercial, Brasil) e 0,1 M de cacodilato de sódio, que foi deixada por 1 hora. Em seguida, as amostras foram desidratadas com uma série de lavagens de soluções de etanol 30, 50, 70, 80, 90 e 100% (v/v) a temperatura ambiente, ficando em contato com cada solução por 10 minutos, repetindo o último passo, com a solução 100 % de etanol, 3 vezes. Em seguida o álcool foi retirado dos poços e foi adicionado 2 mL de hexametildisilazano (Thermo Fisher Scientific, New Jersey, US) por 3 minutos. Após o tempo, o excesso foi retirado e as amostras foram secas totalmente, para finalmente serem revestidas com ouro, em uma camada de aproximadamente 15nm usando o Sputter Coater, Modelo SCD050 (LEICA Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo JSM6510 (JEOL, Tóquio, Japão).

4.9.6 Diferenciação celular

As células recuperadas após o cultivo foram induzidas à diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Para adipócitos e osteócitos foram utilizadas três placas de 24 poços TPP (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), nas quais foram inoculadas 4×10^4 células por poço, em 6 poços por placa. Após 24 horas, o meio dos poços foi substituído por de meio específico de diferenciação do kit StemPro™ (GIBCO, Massachusetts, EUA). Para condrócitos, gotículas de 5 µL com

concentração de 1×10^6 células/mL foram inoculadas em placas sem tratamento e deixadas na incubadora durante 30 minutos, para posterior adição do meio de diferenciação específico do kit StemPro™ (GIBCO, Massachusetts, EUA). Durante o processo de diferenciação foram realizadas trocas da metade do meio indutor a cada 3 dias. As placas foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ durante todo o período de diferenciação. Após completar o tempo de incubação de durante 21 dias para osteócitos e adipócitos e de 14 dias para condrócitos, as placas foram submetidas ao processo de coloração com os indutores específicos empregados para cada caso seguindo o procedimento apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Informações específicas sobre as metodologias utilizadas nos testes de diferenciação celular das CEMs.

| Diferenciação | Indutores específicos | Metodologia |
|---------------|--|---|
| Osteócitos | Dexametasona (10-8M), ácido ascórbico 2-fosfato (50µM) | Para cada poço foi retirado o meio indutor e colocado 500µL de paraformaldeído 4% (v/v) por 30 min, em seguida cada poço foi lavado com água destilada para posterior adição de nitrato de prata 5% (v/v) por mais 30 min em ausência de luz. Seguidamente os poços foram lavados novamente e expostos a luz 100 W por 15 min. Imediatamente foi adicionado Tiosulfato de Sódio por 5 min e finalmente os poços foram lavados com água destilada e observados no microscópio. |
| Condrócitos | | Depois de retirado o meio indutor de cada poço, eles foram lavados com 500 µL de PBS 1x para adicionar em seguida paraformaldeído 2% por 30 min. Após disso, os poços foram lavados com água destilada e incubados em 1% de Azul de Alciano por 1 h. Finalmente os poços são lavados com água destilada e observados no microscópio. |
| Adipócitos | Dexametasona (10-8M) e Rosiglitazona (5µM) | Para cada poço foi retirado o meio indutor e colocado 500µL de paraformaldeído 4% (v/v) por 30 min, em seguida os poços foram lavados com água destilada e incubados em álcool 70% (v/v) por 2 min. Posteriormente, o álcool foi retirado para adicionar o corante Sudan II por 5 min e posterior substituição com álcool 70% (v/v). Finalmente os poços foram lavados com água destilada e observados no microscópio. |

Finalmente, após a diferenciação as placas foram observadas no microscópio óptico para adquirir evidências fotográficas. A diferenciação em osteócitos foi evidenciada pelo acúmulo de cristais de oxalato de cálcio. Por outro lado, adipócitos apresentaram gotículas de gordura coradas em amarelo e os condrócitos, formação de agregados de coloração azulada semi-aderidos à superfície da placa.

4.10 ANÁLISE DE RESULTADOS DE CULTIVO

4.10.1 Cálculo da velocidade específica de crescimento e fator de expansão

Para os cultivos, foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) na fase exponencial, a partir da integração da equação 15, sendo $\mu_{\text{máx}}$ a tangente do gráfico de $\ln(x_{t2}/x_{t1})$ por tempo.

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad \text{Equação 15}$$

Onde, t é o tempo de cultivo em horas e x_{t1} e x_{t2} são os números de células viáveis na fase exponencial de acordo com o tempo t_1 e t_2 , respectivamente.

O fator de expansão celular máximo durante os experimentos foi calculado através da equação 16.

$$FE = \frac{x_f}{x_i} \quad \text{Equação 16}$$

sendo x_f e x_i , as concentrações celulares final e inicial (a partir das 8 horas após a fase de adesão), respectivamente, durante o cultivo.

4.10.2 Rendimento aparente do lactato a partir da glicose

O rendimento aparente da produção de lactato a partir de glicose foi quantificado através da equação 17.

$$Y_{Lac/Glic} = \frac{q_{lac}}{q_{gli}} \quad \text{Equação 17}$$

onde $Y_{Lac/Glic}$ é o rendimento aparente do lactato a partir da glicose, q_{lac} e q_{gli} são a produção de lactato e consumo de glicose durante o intervalo de tempo entre duas amostragens, isto é, $q_{met} = \pm (\Delta_{met}/\Delta_t \cdot \bar{x}_v)$, onde Δ_{met} é a variação da concentração do metabólito durante um período de tempo Δ_t e \bar{x}_v é a média do número de células viáveis durante o mesmo período de tempo.

4.10.3 Histograma de frequência de agregados durante os experimentos

Os histogramas de frequência de agregados com tamanhos menores ou iguais a 0,3 mm durante os cultivos, para a condição de 90 rpm (N_{s1}), foram obtidos com o software Excel 2010 (Microsoft, Washington, EUA), usado para os cálculos, e o OriginPro® (OriginLab, Massachusetts, EUA), para realizar os gráficos. Desta forma, a partir dos tamanhos médios dos agregados em cada tempo, obtidos como descrito no item 4.9.4, o valor máximo e mínimo foi localizado, usando a função de Excel MAXIMO ou MINIMO, e o conjunto de dados. Com estes dados, uma classificação dos tamanhos de agregados (classes) foi calculada com a Equação 18, e o incremento que separa cada classe foi calculado com a Equação 19.

$$Classes = \sqrt{n} \quad \text{Equação 18}$$

Onde n é o número total de dados, neste caso o número total de medidas de tamanho dos agregados.

$$Incremento = \frac{(Máximo-Mínimo)}{Classes} \quad \text{Equação 19}$$

A partir desses dados, uma matriz de três colunas foi construída, sendo que na primeira coluna foram localizados o número de classes obtidas, neste caso numeradas de 1 até \sqrt{n} ; na segunda coluna encontravam-se os valores do tamanho de agregados em *incrementos*, obtidos usando a Equação 20.

$$\text{Tamanho do agregado} = \text{Mínimo} + \sum_{i=1}^{\text{Classes}} i \times \text{incremento} \quad \text{Equação 20}$$

E finalmente, na terceira coluna foi usada a função FREQUÊNCIA, selecionando as células da média dos tamanhos dos agregados, gerada inicialmente pelas réplicas e o conjunto de dados do *Tamanho do agregado*, gerada pela Equação 20 (localizados na segunda coluna da matriz). Desta forma, os histogramas foram construídos com os dados de tamanho do agregado, e a frequência, ou quantidade, de agregado, localizados na segunda e na terceira coluna da matriz.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados dos experimentos realizados, foram apresentados como média \pm erro padrão da média (DP) dos valores obtidos para diferentes réplicas, considerando para os resultados das medidas de caracterização hidrodinâmica e de crescimento celular um $n=3$, e $n=50$ e 100 , para as medidas de tamanho de agregados. Métodos estatísticos como análises de variância (One-way ANOVA) foram empregados para verificar as diferenças significativas entre os resultados de crescimento e tamanho de agregados. Nas análises de significância, um valor p menor a $0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. O programa OriginPro® (OriginLab, Massachusetts, EUA) foi usado para as análises estatísticas.

4.12 PROGRAMAÇÃO E ESTRATÉGIAS ADOTADAS NOS EXPERIMENTOS

O resumo e descrição dos experimentos de avaliação da hidrodinâmica e cultivos realizados, são apresentados na Tabela 13. Inicialmente, foram realizados dois experimentos no BEVT1, com um volume de trabalho de 60 mL, usando a linhagem hMSCs-TERT e o microcarregador MAG, nomeados EEP1 e EEP2 respectivamente. Estes experimentos preliminares, foram realizados para avaliar crescimento, morte celular e controle da agregação no BEVT1, em condições de rotação comumente empregadas no frasco *Spinner*, de 50 e 70 rpm.

A partir das medidas do θ_m , foram verificadas as mudanças na hidrodinâmica como resultado da geometria do cilindro interno, deformado ou totalmente redondo e com estes resultados medições do N_{s1} foram realizadas (ECH21-24) para as duas geometrias. Proporcionadas as informações do N_{s1} , foi escolhida a geometria do BEVT com o cilindro interno deformado, e novas condições foram escolhidas para os experimentos de cultivo. Estes experimentos, nomeados EBT1 e EBT2, foram realizados com CEMs derivadas de cordão umbilical e tecido adiposo, usando o microcarregador Cultispher®S, em condições de rotação iguais e maiores do N_{s1} . Cultivos no frasco *Spinner*, considerado como controle, foram realizados para fins comparativos (EFS1 e EFS2).

Tabela 13. Programação e descrição dos experimentos

| Identificação do experimento | Biorreator | Descrição do experimento | Finalidade |
|------------------------------|------------|---|---|
| Caracterização Hidrodinâmica | | | |
| ECH11 | BEVT 1 | Medição do θ_m através do método térmico e colorimétrico para frequências de rotação de 50 e 70 rpm usadas nos cultivos. | Obtenção de dados de tempo de mistura para condições de agitação normalmente usadas em <i>Spinner</i> . |

Continuação Tabela 13.

| | | | |
|------------------------------|-----------------------|--|---|
| ECH12 | | Medição do coeficiente de transferência de massa ($k_{L,a}$) sem injeção de ar para 50 e 70 rpm. | Avaliação da transferência de oxigênio sem injeção de ar em condições de baixa rotação. |
| ECH13 | | Cálculo das tensões de cisalhamento com relações encontradas na literatura para 50 e 70 rpm. | Verificação de tensões de cisalhamento em condições de rotação baixas. |
| ECH14 | Frasco <i>Spinner</i> | Medição do θ_m através do método colorimétrico para 30 rpm. | Obtenção de dados de θ_m na condição usada no cultivo para fins comparativos. |
| Experimentos preliminares | | | |
| EEP1 | BEVT 1 | Linhagem hMSC-TERT com o microcarregador MAG (3 g/L) a 50 rpm. | Avaliar o crescimento celular e modulação do tamanho de agregados com velocidade de agitação normalmente usadas em <i>Spinner</i> . |
| EEP2 | | CEMs primárias derivadas de cordão umbilical e microcarregador MAG (3 g/L) a 70 rpm. | Avaliar o crescimento celular e modulação de tamanho de agregados com baixa concentração de SFB. |
| Caracterização Hidrodinâmica | | | |
| ECH21 | BEVT 2 | Medição do N_{s1} usando duas metodologias para concentrações entre 1 e 5 g/L de microcarregador Cultispher®S. | Obtenção de dados de frequências de rotação para diferentes concentrações de microcarregador Cultispher®S. |

Continuação Tabela 13.

| | | | |
|--------------------------------|-----------------------|---|---|
| ECH22 | BEVT 2 | Medição do θ_m através do método térmico e colorimétrico para frequências de rotação entre 50 e 120 rpm usadas nos cultivos. | Obtenção de dados de tempo de mistura para as várias condições de rotação usadas nos cultivos. |
| ECH23 | | Medição do coeficiente de transferência de massa ($k_L a$) sem injeção de ar a 90 e 100 rpm. | Avaliação da transferência de oxigênio sem injeção de ar considerando uma maior altura do líquido devido ao aumento do volume de meio de cultivo. |
| ECH24 | BEVT 2 | Cálculo da tensão de cisalhamento com relações encontradas na literatura a 100 rpm. | Avaliação de tensões de cisalhamento a frequências de rotação maiores que o N_{s1} . |
| Performance em cultivo de CEMs | | | |
| EBT1 | BEVT 2 | Cultivo em triplicata com CEMs primárias derivadas de cordão umbilical em microcarregador Cultispher®S (1 g/L) a 100 rpm. | Avaliação em condições de rotação maiores ao N_{s1} para verificar modulação de tamanho de agregados e morte celular através de análise de LDH. |
| EFS1 | Frasco <i>Spinner</i> | Cultivo com CEMs primárias derivadas de cordão umbilical e microcarregador Cultispher® S (1 g/L) a 30 rpm. | Experimento controle no qual serão avaliados crescimento, controle no tamanho de agregados e morte celular através de análise de LDH. |

Continuação Tabela 13.

| | | | |
|------|-----------------------|---|---|
| EBT2 | BEVT 2 | Cultivo em triplicata com CEMs primárias derivadas de cordão umbilical e tecido adiposo em microcarregador Cultispher®S (3 g/L) a 90 rpm. | Avaliação em condições de rotação considerando o N_{s1} para verificar modulação de tamanho de agregados e morte celular através de análise de LDH. |
| EFS2 | Frasco <i>Spinner</i> | Cultivo com CEMs primárias derivadas de cordão umbilical e microcarregador Cultispher®S (3 g/L) a 30 rpm. | Experimento controle no qual serão avaliados crescimento, controle no tamanho de agregados e morte celular através de análise de LDH. |

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DO N_{s1} NO BEVT

O critério de suspensão em um sistema sólido-líquido, atingido tradicionalmente através da agitação, é essencial para a otimização de sistemas químicos e bioquímicos, que envolvam reações ou processos de transporte de massa ou energia. Neste sentido, no cultivo dinâmico de células aderidas a microcarregadores, maiores desafios são enfrentados devido à sensibilidade às forças hidrodinâmicas e tendência à agregação de microcarregadores-células (ROBERTS et al., 2019), sendo importante definir o nível de suspensão requerido para contornar estes dois problemas.

As medidas do N_{s1} foram inicialmente realizadas para uma geometria cilíndrica, porém, após alguns experimentos percebeu-se que quando era usada a membrana de silicone envolvendo o cilindro interno do biorreator, esta sofria uma deformação devido à presença do líquido no espaço anular, permitindo que o cilindro interno adotasse a forma de prisma quadrado. Esta nova geometria e sua influência nas características de escoamento em cilindros concêntricos, gerou a necessidade de estudar estas duas geometrias e avaliar seu potencial.

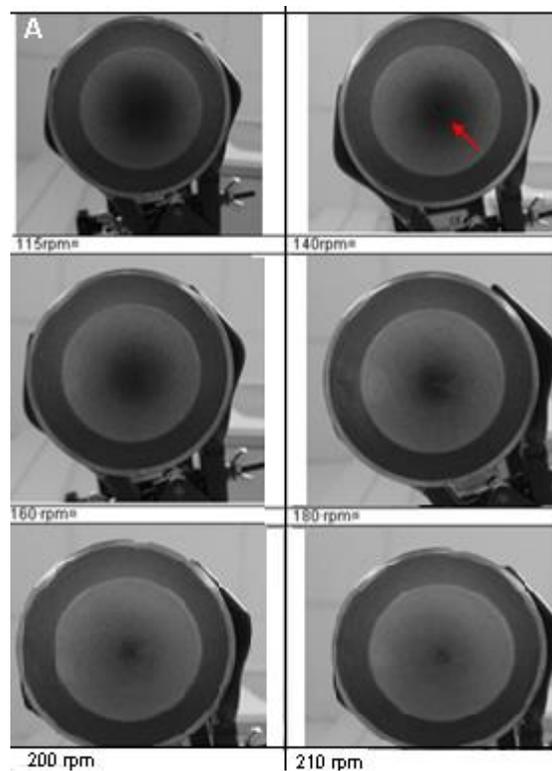
As concentrações do microcarregador (MC) Cultipher®S usadas na quantificação do N_{s1} são apresentados na Tabela 14. Para isto, avaliações inicialmente visuais, permitiram observar a sedimentação e acúmulo dessas partículas no centro da base do BEVT, principalmente quando foi usado o cilindro interno redondo, em velocidades de rotação baixas (menores que 70 rpm), como pode ser observado na Figura 18. Essa sedimentação é causada principalmente pela velocidade nula no centro do BEVT, somada à força centrípeta que as partículas experimentam, causada pela trajetória circular do líquido. Estas primeiras tentativas, foram realizadas com uma distância mínima de 3 mm entre a base do cilindro interno e a base do frasco, devido às maiores distâncias provocarem um aumento do acúmulo dos MCs nesta região do biorreator e, a eliminação desta distancia dificultava o giro do cilindro interno por causa do atrito.

Tabela 14. Quantidade de microcarregadores Cultispher®S utilizadas para determinação de N_{s1} no BEVT.

| | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Nº de microcarregadores/g* | 8×10^5 | 8×10^5 | 8×10^5 | 8×10^5 | 8×10^5 |
| g* | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 |
| Nº de Microcarregadores | 4×10^5 | $3,2 \times 10^5$ | $2,4 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^5$ | 8×10^4 |
| Nº de microcarregadores/mL | 4000 | 3200 | 2400 | 1600 | 800 |
| Gramas de microcarregador/L | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |

*g= gramas de massa seca

Figura 18. Ilustração da sedimentação observada no fundo do BEVT com cilindro interno redondo, apresentada para uma concentração de 2 g/L Cultipher®S em PBS, com velocidades entre 115 a 210 rpm. A região escura indicada pela seta vermelha evidencia a deposição de microcarregadores e sua tendência a diminuir com o aumento da agitação.



Em vista desta problemática foi utilizado um filme fino de poliéster envolvendo completamente o cilindro interno redondo e uma peça de teflon para o cilindro interno deformado (vide seção 4.6), evitando a deposição de uma grande parte dos microcarregadores que ficavam nesta região, garantindo a maior suspensão destes no espaço anular entre os dois cilindros. Nessa nova condição, foi possível obter dados de N_{s1} por inspeção visual para ambas configurações do BEVT, como apresentado na Tabela 15, auxiliadas pelo tingimento dos microcarregadores com o corante violeta cristal (Figura 19).

Tabela 15. Resultados da determinação da N_{s1} no BEVT com PBS a diferentes concentrações de microcarregador Cultispher®S determinados por inspeção visual.

| Concentração de microcarregador Cultispher®S (g/L) | N_{s1} (rpm) | |
|---|----------------|----------------|
| | BEVT Redondo | BEVT Deformado |
| 1 | 90 | 65 |
| 2 | ND | 80 |
| 3 | 120 | 90 |
| 5 | 145 | ND |

ND=Não determinado.

Posteriormente, com o intuito de verificar a confiabilidade dos dados de N_{s1} obtidos visualmente, amostras de MC da parte superior e inferior do BEVT, aproximadamente a 1 cm da superfície superior do líquido e da base (detalhado no tópico 4.12), foram coletadas para determinar a concentração pontual através de medidas de massa seca, obtendo os resultados apresentados na Figura 21. A quantificação da massa seca foi realizada após um período de secagem de 24

horas, garantido a eliminação completa de PBS das amostras de MC como pode ser verificado na Figura 20.

Figura 19. Avaliação do N_{s1} por inspeção visual usando o BEVT com o cilindro interno redondo para 1 g/L de Cultispher®S tingidos com violeta cristal. As velocidades de rotação do cilindro interno nestas imagens foram de 70 (A), 80 (B) e 90 (C) rpm.

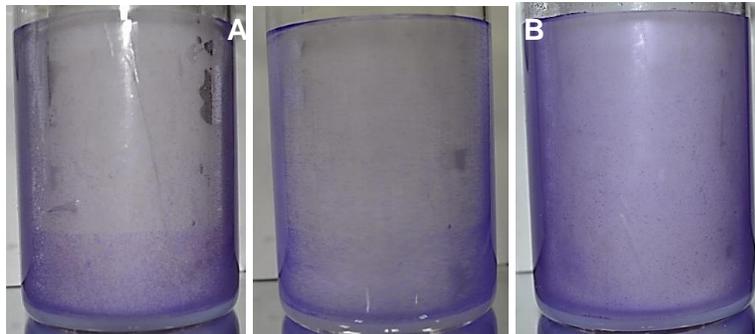
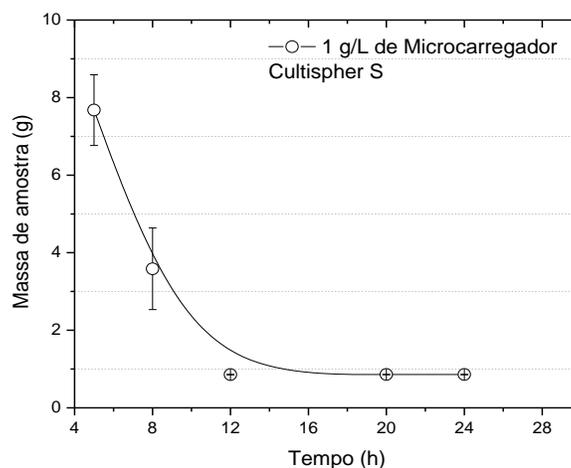


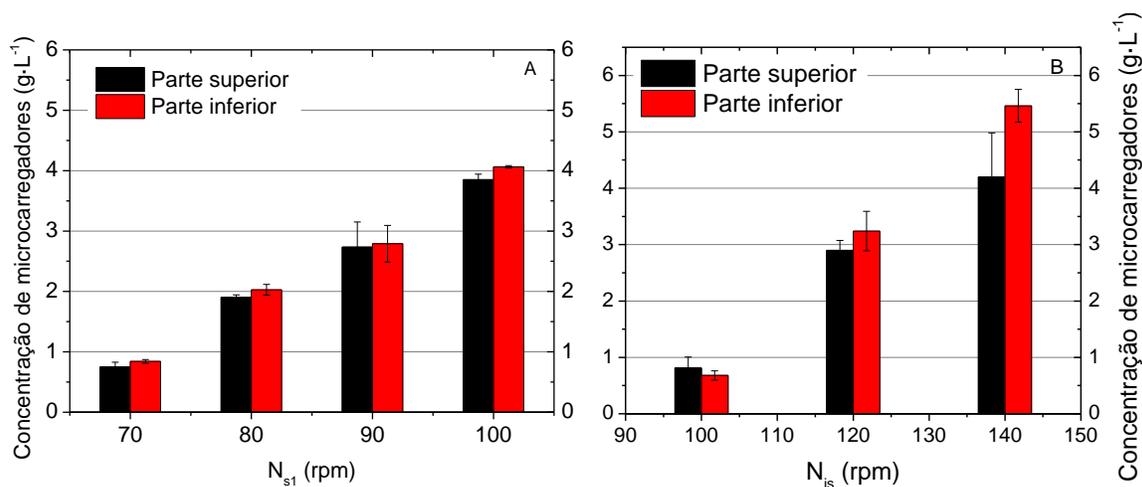
Figura 20. Resultados de verificação do tempo necessário para atingir massa seca constante na determinação do N_{s1} no BEVT através de medidas de massa seca de microcarregadores, $n=3$.



Os resultados obtidos de concentração de MCs em função do N_{s1} para as duas configurações de cilindro interno do BEVT, mostraram uma tendência linear crescente (Figura 21), como observado através da inspeção visual previamente realizada. Tais resultados evidenciaram a necessidade de menores velocidades de

rotação, 30 rpm menos, traduzido em uma menor potência inserida no sistema, para suspender a mesma carga de MCs, quando empregado o BEVT com o cilindro interno deformado, em comparação ao BEVT com o cilindro interno redondo. Isto pode ter ocorrido em razão da mudança no padrão de fluxo mais rápida, causada pela geometria menos arredondada como observado por Tanzeglock (2008). Adicionalmente, a componente de fluxo axial começa a ser importante com o aparecimento do regime de fluxo com vórtices Wavy (FVW), sendo máxima no regime turbulento (NEMRI et al., 2014; NEMRI; CHARTON; CLIMENT, 2016). Considerando isto, nas condições de rotação usadas, o BEVT com cilindro interno deformado propicia a aparição de um regime de transição entre o FVW e o turbulento, nomeado fluxo com vórtices Wavy Modulado (FVWM), e o turbulento. Isto, somado ao menor número de vórtices observados com esta geometria, permitiram obter valores de N_{s1} menores, que os obtidos no BEVT com o cilindro interno redondo.

Figura 21. Resultados das medidas de N_{s1} para o BEVT com o cilindro interno deformado (A) e o BEVT com o cilindro interno normal (B), com concentrações entre 1 a 4 e 1 a 5 g/L, respectivamente, usando microcarregadores Cultispher®S, determinados por retirada de amostras na parte superior e inferior do frasco a diferentes frequências de rotação com $n=3$.



Resultados de N_{s1} obtidos usando outros tipos de MCs e de impelidores são apresentados na Tabela 16 e Figura 22. A partir desses dados, e considerando a Equação 3 (vide seção 2.4), nota-se que o N_{s1} é um parâmetro fortemente relacionado com a geometria do impelidor. Uma geometria específica do impelidor

pode contribuir para a geração de componentes de fluxo axiais e radiais, facilitando a suspensão rápida das partículas e uma boa mistura, como acontece com os impelidores de lâminas usados nos biorreatores de tanque agitado, resultando em menores N_{s1} (Tabela 16). Em contrapartida, o impelidor pode promover a convergência do fluxo que acontece normalmente embaixo do impelidor, provocando a sedimentação e agregação de partículas nesta região (JAFARI; TANGUY; CHAOUKI, 2012; KAISER et al., 2013).

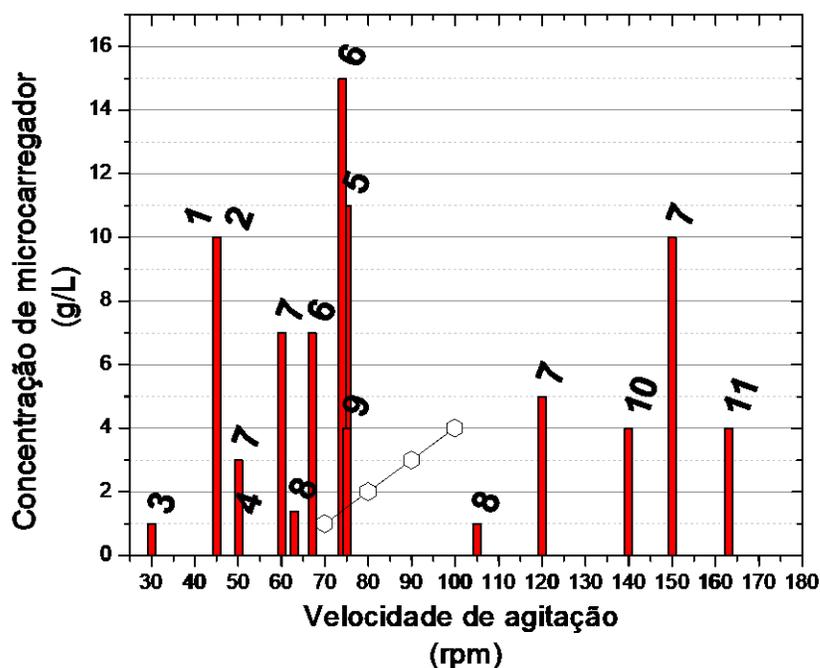
Tabela 16. Medidas de N_{s1} realizadas com microcarregadores empregados em cultivo de células animais dependentes de ancoramento em diferentes concentrações e com vários tipos de impelidores em biorreator tipo tanque agitado.

| Microcarregador | Concentração (g/L) | Impelidor | N_{s1} (rpm) | Referência |
|---------------------------|--------------------|---|----------------|--------------------------|
| Cytodex 3® | 10 | 6-Lâminas inclinadas 45° e InterMIG-duplo | 45 | IBRAHIM; NIENOW, 2004 |
| Cytodex 3® | ~1 | Barra horizontal | 50 | HEWITT et al., 2011 |
| | | Pás verticais e barra | 30 | |
| Colágeno | 7 | 4-Lâminas inclinadas (descentralizado) | 67 | LAWSON et al., 2017 |
| | 15 | | 74* | |
| Plastic P102-L (SoloHill) | ~11 | 3-Lâminas inclinadas 45° | 75* | RAFIQ et al. 2013 |
| | 10 | | 150 | |
| ProNectin ®F | 2.9 | 3-Lâminas inclinadas 30° | 50* | SCHIRMAIER et al., 2014 |
| | 7.1 | | 60* | |
| | 5 | | 120 | |
| Hillex II ProNectin | 1,4 | Pá-barra | 105 | KAISER et al., 2013 |
| | | Rushton | 63 | |
| Cytodex 1™ | 4,8 e 12** | Turbina Helice Marino | 163 | (COLLIGNON et al., 2016) |
| | | Orelha de elefante | 140 | |
| | | | 75 | |

*Emprego de chicanas. **Não houve diferenças significativas do N_{s1} com as três concentrações de microcarregadores testadas.

Na Figura 22, encontram-se os dados de N_{s1} encontrados na literatura e os obtidos para o BEVT com o cilindro interno deformado, representados por círculos pretos vazios, sendo estes próximos e em alguns casos, de duas a três vezes maiores ou menores que outros tipos de impelidores. Nesta coleta de dados, também foi evidenciada a importância das chicanas, na rápida suspensão dos MCs, traduzido em valores baixos de N_{s1} (Tabela 16).

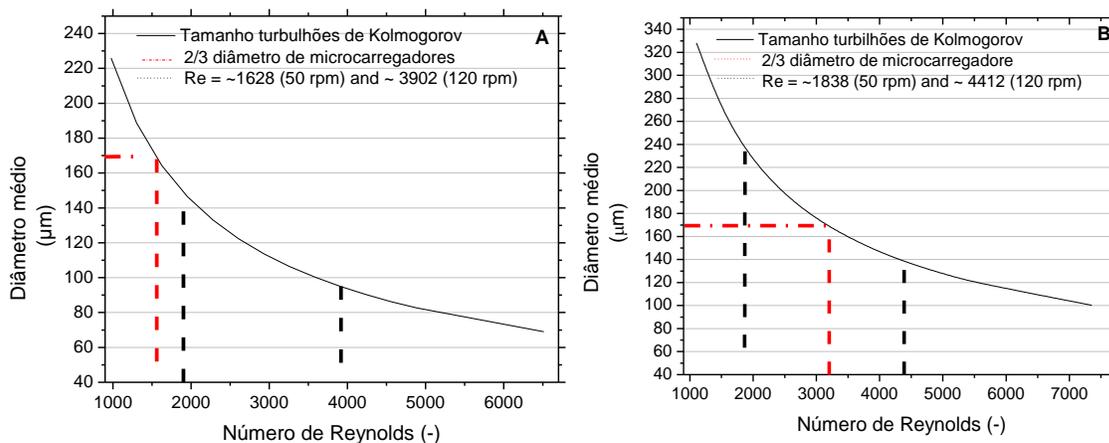
Figura 22. Comparação dos resultados de N_{s1} para diferentes cargas de microcarregadores, frequência de rotação e tipos de impelidor: 1) 6 lâminas inclinadas 45°; 2) InterMIG-duplo; 3) Pulga e pás verticais; 4) Pulga horizontal; 5) 3-pás inclinadas 45°; 6) Pás; 7) 3 lâminas inclinadas 30°; 8) Pás e barra; 9) Orelha de elefante; 10) Turbina Marine e 11) Turbina Rushton de 4 pás, encontrados na literatura e os obtidos com o BEVT com o cilindro interno deformado (círculos vazios pretos).



Outros fatores importantes a serem considerados na quantificação do N_{s1} , são as características das partículas, como a densidade, diâmetro e concentração. No caso do cultivo de células aderentes, os microcarregadores, manufacturados com diferentes materiais e tamanhos entre 125 e 380 μm , possuem uma densidade próxima à do meio de cultivo. Contudo, estes parâmetros tendem a aumentar durante o cultivo devido ao crescimento celular, sendo recomendado o incremento gradual da velocidade de agitação, para evitar os problemas que surgem com a formação de grandes agregados (LAWSON et al., 2017).

Por outro lado, teoricamente, o dano às células aderidas aos microcarregadores pode ser consequência do tamanho dos turbilhões gerados pela agitação e quantificados através da escala de Kolmogorov (η). Considerando os valores obtidos de N_{s1} , e a taxa de energia dissipada (item 4.7.4), o tamanho destes turbilhões através da Equação (4) para o BEVT com o cilindro interno redondo e deformado, foi calculado. Os resultados obtidos para o BEVT com cilindro interno redondo e deformado, são apresentados na Figura 23A e 23B, respectivamente.

Figura 23. Relação do diâmetro médio dos turbilhões de Kolmogorov (η) e o número de Reynolds para o BEVT com cilíndrico interno redondo (A) e cilindro interno deformado (B). Os cálculos foram realizados usando as equações do item 4.7.4 e a Equação 4. A linha pontilhada vermelha indica a condição limite de velocidade de rotação.



Considerando a teoria da escala de Kolmogorov (η), a viabilidade celular não será comprometida se o η permanece maior o igual ao tamanho das partículas, $\eta \geq \sim 0,6 d_{\text{microcarregador}}$ (NIENOW et al., 2014). Neste caso considerando o diâmetro médio do Cultispher®S (250 μm), seria necessária uma condição em que o η seja maior o igual que 153 μm , evidenciando que para o BEVT com o cilindro interno redondo, um número de Re abaixo de 1619 (50 rpm) teria que ser usado, para evitar que o tamanho dos turbilhões de Kolmogorov provocassem morte celular através da remoção das células da superfície do MC (Figura 23A). Portanto, relacionando o η com o N_{s1} obtido para este, concentrações de partículas muito baixas deveriam ser usadas, menores que 1 g/L, para garantir um ambiente homogêneo sem agredir

as células aderidas aos microcarregadores. Por outro lado, para o BEVT com o cilindro interno deformado, frequências de rotação de até 90 rpm, Re de ~3300, com concentrações de Cultispher®S de 3 g/L ou menores podem ser usadas (Figura 23B).

Jossen e colaboradores encontraram para o tanque agitado, valores de η mínimos entre 60 e 70 μm , usando o N_{s1u} (49 rpm) e o N_{s1} (60 rpm), sendo menores do que os considerados para não causar remoção e dano celular ($\eta \geq 141 \mu\text{m}$). Estes pesquisadores justificaram o uso dessas condições, devido à leve exposição a desses turbilhões pelos baixos tempos de circulação e tempos de residência obtidos por eles, embora não tenham sido apresentados dados confirmando ausência de morte celular (JOSSEN et al., 2018). Schirmaier e colaboradores, também encontraram valores de η menores do que o limite de remoção ($\eta \geq 101 \mu\text{m}$), usando o critério de suspensão para três escalas do tanque agitado, com ausência também de uma medida quantitativa da ausência de morte celular. Adicionalmente, os valores do η tender a piorar com o aumento de escala, ficando próximos de 10 e 15 μm (SCHIRMAIER et al., 2014). Neste sentido, ferramentas computacionais podem contribuir com informações importantes, possibilitando prever a fração de volume desses turbilhões, junto a variáveis como a agregação, que implicam um aumento do impacto desses turbilhões devidos aos requerimentos de agitação (LAWSON et al., 2017).

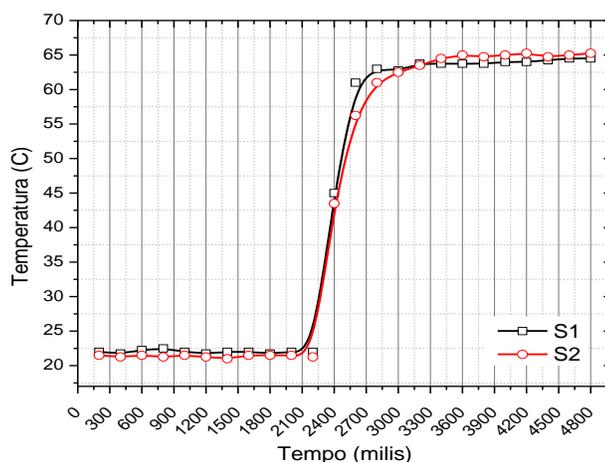
5.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE MISTURA (Θ_M) PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO

O tempo de mistura (θ_m) na área de cultura celular é considerado crítico em relação às variáveis, como concentração de nutrientes e pH, este último controlado muitas vezes pela adição localizada de ácido ou base fortes. Estudos realizados, por Osman e colaboradores (2001), destacam os efeitos no metabolismo, crescimento e secreção de produto, causados por mudanças do pH de um cultivo de células de mieloma, confirmando a importância da medição deste parâmetro para evitar perdas no rendimento de um cultivo pela presença de zonas heterogêneas.

Desta forma, são desejados θ_m baixos, que assegurem um alto grau de homogeneidade.

Considerando as duas configurações do BEVT, foram coletados dados de tempo de mistura, obtidos através do ensaio tipo pulso com um traçador de calor e através de sensores de temperatura. Prévio a isto, o tempo de resposta destes sensores foi obtido através de um ensaio em degrau, como apresentado na Figura 24, obtendo-se um valor de 0,55 s.

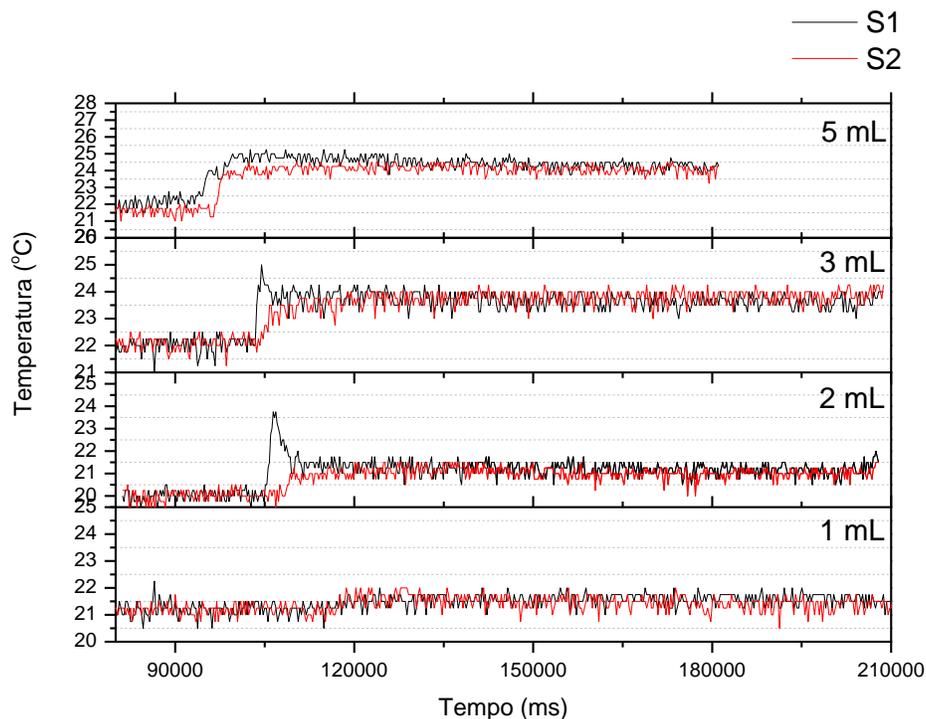
Figura 24. Perfil de resposta dos sensores para determinação do tempo de resposta. O S1 é o sensor superior, colocado aproximadamente a 7 cm da superfície, e o S2 é o sensor inferior, localizado a 0,5 cm da base, os dois colocados dentro do BEVT.



A verificação da quantidade do traçador de calor (água quente), que forneceu menor interferência na variável resposta (θ_m), foi também necessária. Para tal fim, testes usando o BEVT com o cilindro interno redondo a 120 rpm e volumes de 1, 2, 3 e 5 mL de água quente ($\sim 100^\circ\text{C}$), foram injetados no topo do biorreator, obtendo-se diferentes perfis, como apresentado na Figura 25. Esses resultados demonstram que a injeção de 1 mL do traçador no volume de trabalho (100 mL), não influenciou a resposta do sinal do sensor, apresentando um incremento na temperatura média menor que $0,5^\circ\text{C}$, permanecendo na faixa do erro dos sensores. Com o acréscimo de 2 mL do volume do traçador de calor, o aumento do sinal do sensor foi mais pronunciado, obtendo-se um valor do θ_m de $34 \pm 2,51$ segundos. Utilizando um volume de 3 mL, foi obtido um θ_m de $16 \pm 4,00$ segundos, e com a injeção de 5 mL, uma resposta instantânea foi observada, concluindo-se que uma influência

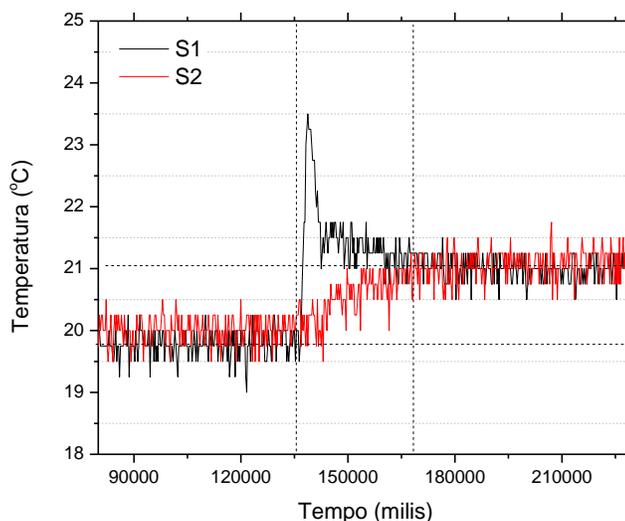
significativa no θ_m pode ser esperada com adicionados de volumes maiores a 3% do volume total. Isto posto, foram realizadas as medições experimentais do θ_m em outras condições de rotação do BEVT, usando um volume do traçador de calor de 2 %.

Figura 25. Perfil de dados coletados pelo método térmico através da injeção do traçador de calor com volumes de 1, 2, 3 e 5 % para a verificação da influência no θ_m , com S1 indicando a posição do sensor superior, próximo à superfície do líquido, e S2 o sensor inferior, localizado próximo da base do BEVT.



O perfil típico das medidas obtidas do θ_m no BEVT, é apresentado na Figura 26, evidenciando a resposta rápida do sensor superior (S1), posicionado mais próximo à adição do traçador, e a progressiva mudança da resposta do sensor inferior (S2), devido a sua localização na base do BEVT, que era o esperado. Neste caso, os valores obtidos do θ_m , foram os atingidos até que a temperatura ($T(t)$) mostrara um valor estável, com uma variação de $\pm 1^\circ\text{C}$ do valor final, ou seja, o θ_{99} . Essa consideração, do θ_{99} , é mais adequada, já que permite uma menor variabilidade nos tempos de mistura obtidos considerando vários pontos da adição do traçador (DISTELHOFF; MARQUIS, 2001).

Figura 26. Perfil de dados coletados pelo método térmico para a obtenção do θ_m do BEVT normal a 100 rpm. Medições realizadas com um sensor de temperatura localizado na parte superior (S1), a 0,5 cm da superfície, e um inferior (S2), a 0,5 cm da base, com volume de injeção de água quente (80°C) de 3 mL em 97 mL de água a temperatura entre 19-23°C encontrados dentro do BEVT.



Dessa forma, nas Tabela 17 e 18, são apresentados os θ_{99} para o BEVT com o cilindro interno redondo e deformado, respectivamente, através do método térmico, obtidos a partir dos perfis de mudança de temperatura, e a partir do método colorimétrico, coletados através da inspeção visual usando uma base forte e um indicador de pH (ver tópico 4.7.2). Os resultados obtidos através de ambos métodos apresentaram valores próximos entre eles, e permitiram evidenciar a diminuição do θ_m com a transição do regime FWV para o turbulento, principalmente para o BEVT com o cilindro interno redondo em velocidades de rotação menores a 70 rpm. Estas observações são coerentes com o mencionado por Nemri e colaboradores (2014), no que se refere ao aumento significativo da transferência de massa no fluxo turbulento sobre outros regimes (NEMRI et al., 2014). Em contrapartida, no BEVT com o cilindro interno deformado, foram menos evidentes as diferenças ou acréscimos em termos de θ_m , devido a que nas velocidades de rotação usadas, prevalece a presença do regime FWV modulado, um regime de transição mais próximo do turbulento, e o turbulento (NEMRI; CHARTON; CLIMENT, 2016).

Tabela 17. Resultados do θ_{99} no BEVT com o cilindro interno redondo pelo método colorimétrico (visual) e através do método térmico em triplicata, $n=3$.

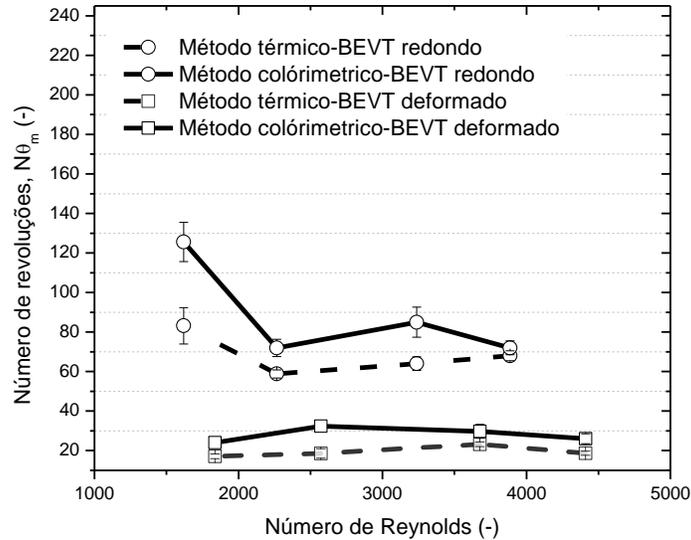
| Frequência de rotação (rpm) | Tempo de mistura (s) | | Re | Regimes de fluxo |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|------|------------------|
| | Método térmico | Método colorimétrico | | |
| 50 | 104± 9,19 | 157±9,89 | 1619 | Fluxo FWV |
| 70 | 49 ± 2,00 | 60±4,35 | 2267 | Fluxo turbulento |
| 100 | 38 ± 3,46 | 50±7,63 | 3238 | Fluxo turbulento |
| 120 | 34± 2,51 | 30±3,40 | 3886 | Fluxo turbulento |

Tabela 18. Resultados do θ_{99} no BEVT com o cilindro interno deformado pelo método colorimétrico (visual) e através do método térmico, $n=3$.

| Frequência de rotação (rpm) | Tempo de mistura (s) | | Re | Regimes de fluxo |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|------|--------------------|
| | Método térmico | Método colorimétrico | | |
| 50 | 21,1 ± 2,23 | 30,5 ± 1 | 1838 | Fluxo FWV modulado |
| 70 | 15,4 ±2,41 | 27 ± 2,2 | 2574 | Fluxo turbulento |
| 100 | 13,6 ± 1,22 | 17,5±3,53 | 3677 | Fluxo turbulento |
| 120 | 9,3 ± 1,00 | 13±2,51 | 4412 | Fluxo turbulento |

Os resultados de θ_m também podem ser apresentados através do número adimensional de tempo de mistura, $N\theta_m$, representando as rotações necessárias para atingir um certo grau de homogeneidade (Figura 27). No caso do BEVT com o cilindro interno deformado, tanto as medidas visuais, como as obtidas através do método térmico, mostram uma tendência mais constante, comumente observado em condições de turbulência (NAGATA, 1975). Por outro lado, o BEVT com o cilindro interno redondo, mostra a necessidade de um número maior de rotações, em velocidades menores que 70 rpm, para que um grau de mistura comparável ao atingido no regime turbulento.

Figura 27. Resultados de revoluções $N\theta_m$ para o BEVT com o cilindro interno redondo (círculos) e cilindro interno deformado (quadrados) pelo método colorimétrico (visual) e através do método térmico.

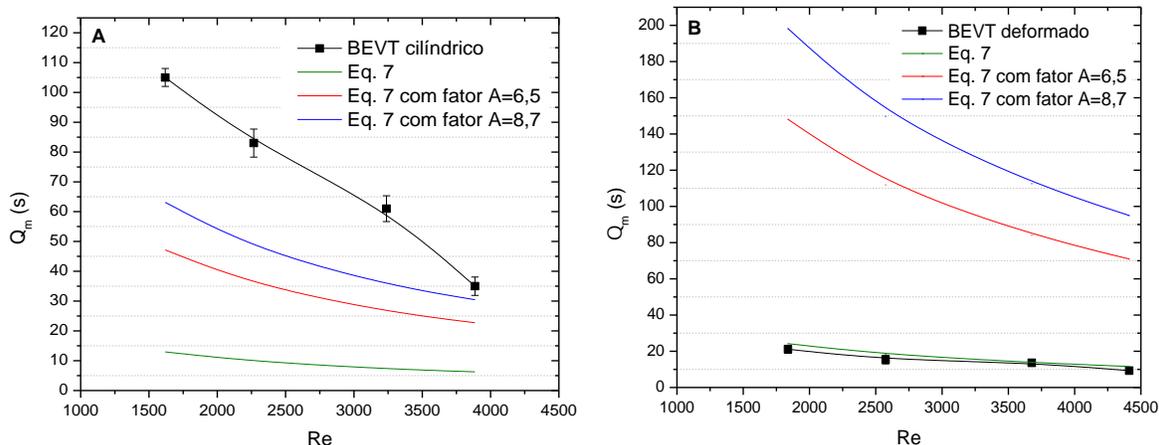


Adicionalmente, foi usada a correlação ajustada por Nienow (1997), inicialmente proposta por Ruszkowski para o tanque agitado com um impelidor tipo turbina Rushton, que considera a constante A de 5,9 e uma relação de aspecto de $H/T=1$ (Equação 6), sendo que em nosso caso, $H/T=1,09$ e $0,94$, para o BEVT com cilindro interno redondo e deformado respectivamente, (Figura 28). Usando esta correlação para dois tipos diferentes de impelidores, foram obtidos outros valores do fator A , de 6,5 e 8,7 (KAISER et al., 2011), também avaliados na Figura 28, para a duas configurações do cilindro interno do BEVT. No caso do BEVT com o cilindro interno deformado, observou-se que os valores do θ_m obtidos, foram mais próximos aos calculados com a Equação 6 usando o fator A de 5,9. Em contrapartida, os resultados do BEVT com o cilindro interno redondo, não se aproximaram a nenhum valor obtido pelas correlações, só se mostrou próximo na máxima velocidade de rotação testada, com a correlação usando o fator A de 8,7.

$$\theta_m = 5,91 \left(T^{\frac{2}{3}} \right) \left(\frac{\rho V}{P} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{T}{D} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Equação 6

Figura 28. Resultados experimentais do tempo de mistura (θ_m), encontrados através do método térmico, em função do número de Reynolds para o BEVT com o cilindro interno redondo (A) e com o cilindro interno deformado (B). As correlações foram obtidas para tanque agitado com chicanas.



Embora o θ_m seja um parâmetro que também depende da potência e propriedades do fluido, a relação entre o θ_m e o tipo de fluxo gerado pela geometria do impelidor ficou evidente em ambas configurações do BEVT. No caso do BEVT com cilindro interno redondo, foram observados θ_m mais longos e dependentes da velocidade de rotação, principalmente para velocidades baixas, devido ao regime de fluxo gerado nessas condições e o maior número de vórtices, como pode ser observado nas Figuras 29 e 30, que mostram os 6 e 8 vórtices no BEVT com o cilindro interno deformado e redondo, respectivamente (DISTELHOFF; MARQUIS, 2001; YEOH; PAPADAKIS; YIANNESKIS, 2005).

Figura 29. Visualização dos vórtices no BEVT com o cilindro interno deformado pelo método colorimétrico a 500 rpm, usando glicerina pura misturada com $0,004 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de vermelho de fenol e a adição de 10 M de NaOH.

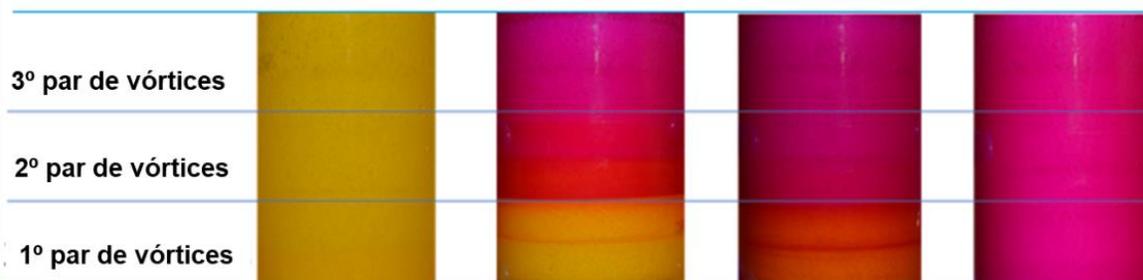
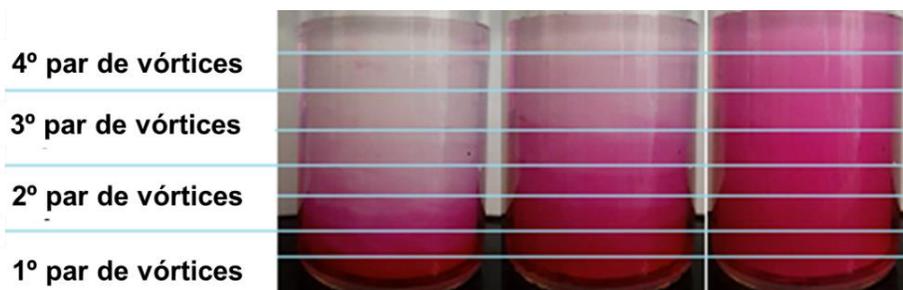


Figura 30. Visualização dos vórtices no BEVT com o cilindro interno redondo pelo método colorimétrico a 70 rpm, usando água com $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenolftaleína e a adição de 10 M de NaOH.



Na Tabela 19 estão representados os resultados do θ_m encontrados na literatura para diferentes impelidores, na posição central e sem perturbações dinâmicas de velocidade de agitação. Estes dados, sugerem que os impelidores de lâminas proporcionam menores θ_m , devido à geração de fluxo axial e circumferencial, que oferecem uma rápida mistura, como mostrado por Kaiser e colaboradores (2013). Comparando esses dados de θ_m e os obtidos para ambas configurações do BEVT, estes foram até dez vezes menores nas mesmas condições de rotação. Considerando outros estudos com o BEVT, diferenças nos θ_m podem ocorrer devido às diferentes dimensões geométricas usadas, especificamente as relações Γ e σ (Tabela 14), que podem influir também na rapidez da transição dos regimes de fluxo (CURRAN; BLACK, 2005a; DENG et al., 2009; EDWARDS; BEANE; VARMA, 1991).

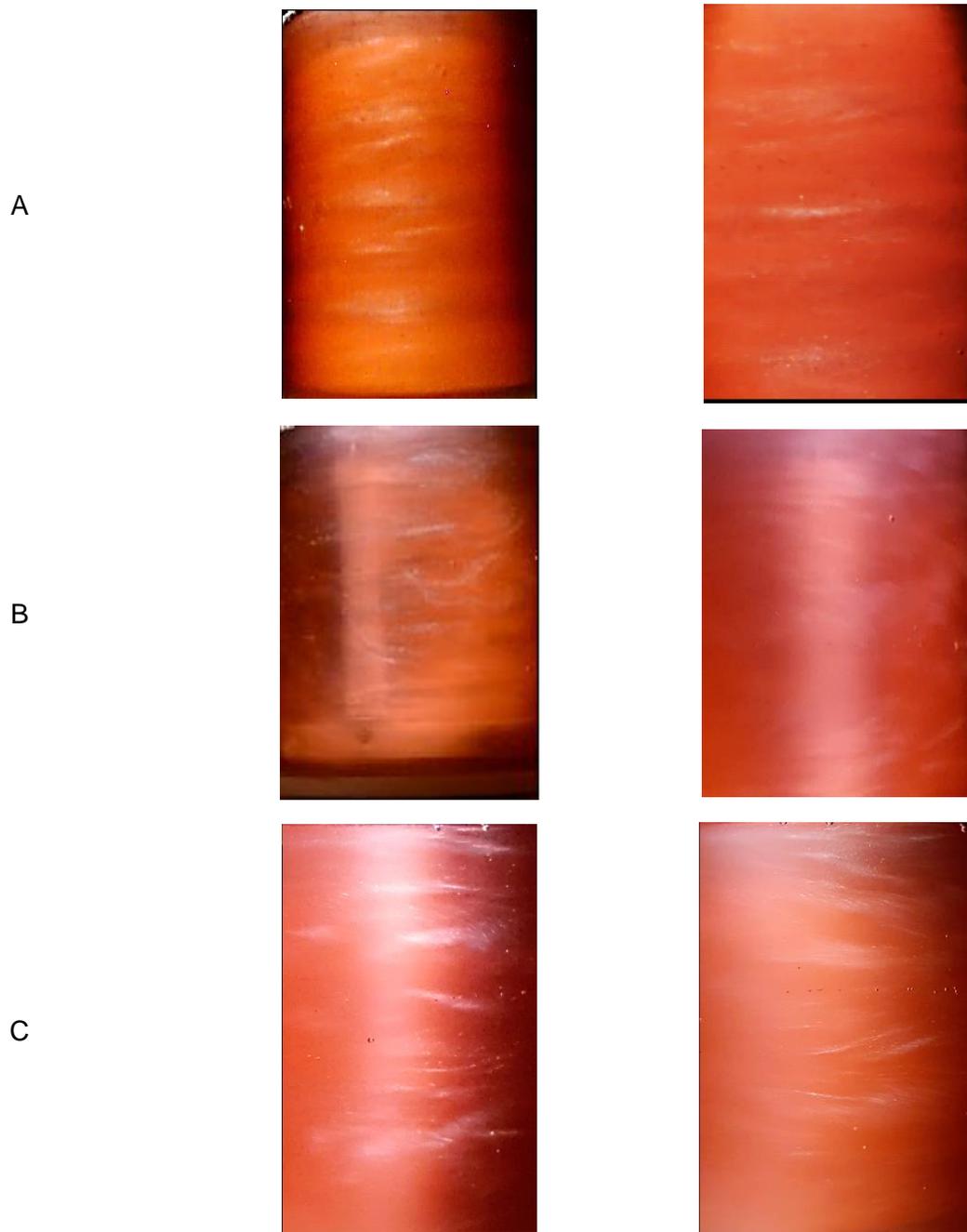
A visualização do escoamento de fluxo em três configurações de cilindros internos, redondo, deformado e quadrado, esta última considerada por apresentar uma geometria mais próxima com a deformada, foi realizada através do uso de um fluido reoscópico de cor vermelha (Figura 31). Um volume de 100 mL e velocidades de rotação de 50 e 120 rpm foram utilizadas. Pelas imagens obtidas foi evidenciada a rápida mistura com as configurações menos arredondadas, como foi observado também no tempo de mistura, devido ao rompimento da simetria rotacional do fluxo eliminando de regiões de baixa velocidade e proporcionando uma distribuição da taxa de cisalhamento mais homogênea (SOOS; WU; MORBIDELLI, 2007).

Tabela 19. Levantamento de dados tempos de mistura (θ_m), usando diferentes técnicas, para vários tipos de impelidores encontrados na literatura.

| Tipo de impelidor | Re | Volume de trabalho (L) | θ_m (s) | $N\theta_m$ | Ref. |
|---|-------|------------------------|----------------|-------------|-------------------------------------|
| BEVT (cilindro normal) | 3886 | | 34 | 68 | |
| BEVT (cilindro deformado) | 4412 | 0,1 | 9,3 | 18,6 | Este trabalho |
| Frasco spinner | 1510 | 0,1 | 22 | 11 | (HEWITT et al., 2011) |
| Pás retas inclinadas a 60° (tipo <i>Pitched Blade</i>) | | | 4,9 | 49 | |
| Pás retas inclinadas a 45° (tipo <i>Pitched Blade</i>) | 24000 | 2400 | 5,2 | 52 | (DISTELHOFF; MARQUIS, 2001) |
| Turbina Rushton | | | 5,7 | 57 | |
| Tipo Butket | | | 6,2 | 62 | |
| Hiperboloides | | | 17 | 170 | |
| Turbina Rushton | 40000 | 0,8 | 0,92 | 33,2 | (YEOH; PAPADAKIS; YIANNESKIS, 2005) |
| 3 Pás | 33900 | 3 | 100 | 80 | (BARRETT et al., 2010) |
| Pás 30° (tipo <i>Pitched Blade</i>) | 8700 | 1,8 | ≤ 60 | ≤ 125 | (OSMAN; BIRCH; VARLEY, 2001) |
| Cilindro (homólogo do BEVT) | 958 | 0,55 | 80 | 80 | (LEGRANDT; COEURET, 1986) |
| Pás (tipo <i>Pitched Blade</i>) | 23860 | 4,5 | 3,65* | 14,5 | (VALLEJOS et al., 2011) |
| 3-4 Pás retas inclinadas a 30° (tipo <i>Pitched Blade</i>) | ----- | 2,2 | 18 | 5 | (SOUSA et al., 2015) |
| | | 0,25 | 56 | 42 | |
| Tipo disco | 42000 | 0,75 | >3600 | >500 | (SÁNCHEZ CERVANTES et al., 2006) |
| Wavy | ----- | 100 | 60 | | (SINGH, 1999) |
| Airlift (1vvm) | ----- | 2, 5 e 10 | 22, 17 e 33 | | (CERRI, 2009) |

$N\theta_m$ = Número de rotações do impelidor com N em rps (adimensional). *Vazão de ar de 0,01 vvm.

Figura 31. Regime de fluxo ocorrendo a velocidades de rotação de 50 e 120 rpm em três configurações de cilindro interno no BEVT, visualizadas através do uso de um fluido reoscópico. Imagens obtidas com (A) cilindro interno redondo, (B) cilindro interno deformado e (C) cilindro interno quadrado.



Finalmente, nas Tabelas 20 e 21 são apresentadas algumas das características hidrodinâmicas importantes consideradas neste trabalho, com a finalidade de permitir comparações entre o BEVT com cilindro interno deformado e o tanque agitado ou frasco *Spinner*. Na Tabela 20, pode-se observar a proximidade dos valores de características hidrodinâmicas entre o frasco *Spinner* e o BEVT com o cilindro interno deformado, a pesar da necessidade de maior potência deste último para atingir esses dados, discriminando as vantagens do BEVT quando são considerados dados médios apresentados normalmente em estudos.

Tabela 20. Resumo das características hidrodinâmicas do BEVT e do biorreator de tanque agitado (frasco *Spinner*) analisados neste trabalho.

| Biorreator | Biorreator | | |
|---|-----------------|----------------|-----------------------|
| | BEVT cilíndrico | BEVT deformado | Frasco <i>Spinner</i> |
| Velocidade de rotação (rpm) | 100 | 100 | 30 |
| θ_m (s) | 38±3,46 | 20,6±2,23 | 14±3,21 |
| Escala de Kolmogorov, η (μm) | 106* | 155* | 183** |
| Taxa de dissipação de energia, $\epsilon \times 10^{-4}$ (w/kg) | 35* | 7,6* | 8,8** |

*Dados médios calculados neste trabalho. **Dados médios para o frasco *Spinner* obtidos de HEWITT et al., (2011).

Adicionalmente, na Tabela 21, mostram-se as diferenças existentes nas características físicas que determinam várias das vantagens do BEVT sobre o tanque agitado, como a ausência de defletores e o tamanho do impelidor, que entre outras coisas permite acréscimos na transferência de oxigênio, pela presença da membrana de silicone, e maior homogeneidade em termos de taxa de dissipação de energia, e portanto, de tensões de cisalhamento.

Tabela 21. Comparação de algumas características físicas a serem consideradas no escalonamento do BEVT e do biorreator de tanque agitado tradicional.

| Característica | BEVT | Tanque agitado |
|------------------------------------|---|---|
| Geometria do frasco | Cilíndrico com fundo plano | Cilíndrico com fundo curvo |
| Defletores | Não precisa. | Precisa para uma boa mistura. |
| Tipo de impelidor e rotação | Vertical com rotação combinando três direções: azimutal, radial e axial | Vertical com rotação no plano horizontal. |
| Zona do impelidor | >50 % da massa do biorreator. | 5-10% da massa do biorreator |
| Aeração | Sem formação de bolhas através de uma membrana de silicone. | Através de aspensor localizado na base. |

5.3 CULTIVOS NO BEVT E FRASCO SPINNER

Todos os experimentos de cultivo apresentados a seguir, foram realizados em ausência de injeção forçada de ar através do BEVT com cilindro interno deformado, uma vez que nas condições de rotação escolhidas, os valores de k_La (maior a $0,9 \text{ h}^{-1}$) permitiram o suprimento pleno de oxigênio dissolvido. Estes experimentos foram realizados considerando uma distância de 3 mm entre o cilindro interno e a base do biorreator. Desta forma, os primeiros dois experimentos identificados como preliminares na Tabela 16, foram realizados no BEVT1, com 60 mL de volume de trabalho, permitindo a formação de apenas um par de vórtices. Nesses experimentos exploratórios, identificados como EEP1 e EEP2, foram usados dois tipos de células, a linhagem hMSC-TERT de medula óssea e CEMs-CU, com concentração de 3 g/L de microcarregados MAG.

Nos seguintes experimentos, realizados no BEVT2, caracterizado por ter uma relação maior de L/d, foi operado com um volume de trabalho de 100 mL, obtendo-se 3 pares de vórtices. Neste biorreator foram realizados experimentos, descritos na Tabela 16 como EBT1 e EBT2, utilizando CEMs primárias de cordão umbilical e

de tecido adiposo, com o microcarregador comercial Cultispher®S em concentrações de 1 e 3 g/L. Experimentos realizados no frasco *Spinner* também foram realizados para fins comparativos. Dessa forma, a seguir são apresentados os resultados obtidos para cada condição usada, e no final deste capítulo uma discussão desses resultados comparados aos encontrados na literatura para outros biorreatores será apresentada.

5.3.1 Resultados dos experimentos preliminares no BEVT1

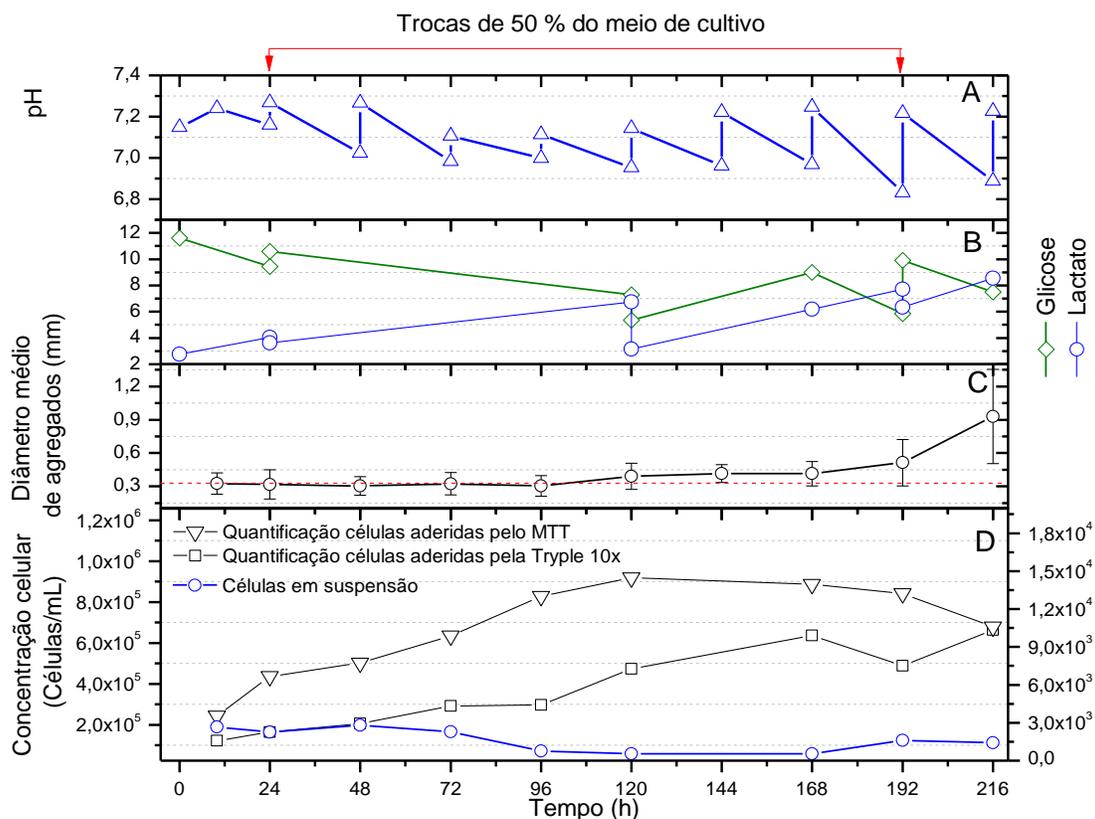
Nos resultados do experimento EEP1, realizado a 50 rpm com a linhagem hMSC-TERT e uma concentração de 3 g/L de microcarregadores MAG, um crescimento gradual durante os primeiros 5 dias foi observado, acompanhado por uma formação tardia de agregados. Após as 120 horas, o início da fase estacionária foi evidenciado (Figura 32 D), devido possivelmente à falta de área disponível para crescimento, como foi observado no registro fotográfico apresentado na Figura 63.

Finalmente, após 192 horas de cultivo a fase de declínio foi atingida devido a excessiva agregação, resultando em tamanhos de agregados médios próximos a 1 mm (Figuras 32C e 63), como consequência do aumento do número de células nos MCs que causou a sedimentação destes. Desta forma, dificultando a recuperação de células viáveis principalmente dos agregados com diâmetros maiores que 0,40 mm, dos quais a maioria, possivelmente, com centro necrosado formado pela indisponibilidade de nutrientes e oxigênio para as células encontradas no interior destes (SEN; KALLOS; BEHIE, 2001; WU et al., 2014). Nestas condições de agitação (50 rpm) foi atingida uma taxa específica de crescimento máxima μ_{max} de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e uma densidade celular máxima de 8,87 e $6,63 \times 10^5$ células/mL, representando um fator de expansão de 7,1 e 5,4, obtidos através do kit MTT e da recuperação enzimática pela TrypLE®Select (1X), respectivamente.

Em termos de consumo de nutrientes, durante o experimento foi observado uma queda gradual dos substratos glicose e glutamina, entretanto, sem atingir valores limitantes em função das trocas de meio realizadas após as 24 horas. A produção máxima de lactato e amônia, atingidas no final do cultivo, foi de 8,56 e

0,12 mM, respectivamente. Embora essas concentrações sejam relativamente altas, principalmente a do lactato, são menores do que aquelas encontradas para inibir o crescimento de CEMs (SCHOP et al., 2010). A atividade glicolítica das células ($Y_{lac/gli}$) neste experimento foi de 1,26. O pH foi mantido pelo controle da porcentagem de CO_2 entre 6,8 e 7,3 durante todo o cultivo (Figura 32 A).

Figura 32. Resultados do experimento EEP1 realizado no BEVT1 a 50 rpm usando meio MesenPRO (Gibco) com 2% de SFB, para cultivo da linhagem hMSC-TERT com inoculo de $7,5 \times 10^6$ células em 3 g/L de microcarregador MAG. Em A) pH; B) concentração de glicose e lactato; C) diâmetro médio de agregados e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE® Select (1X) e número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=3.

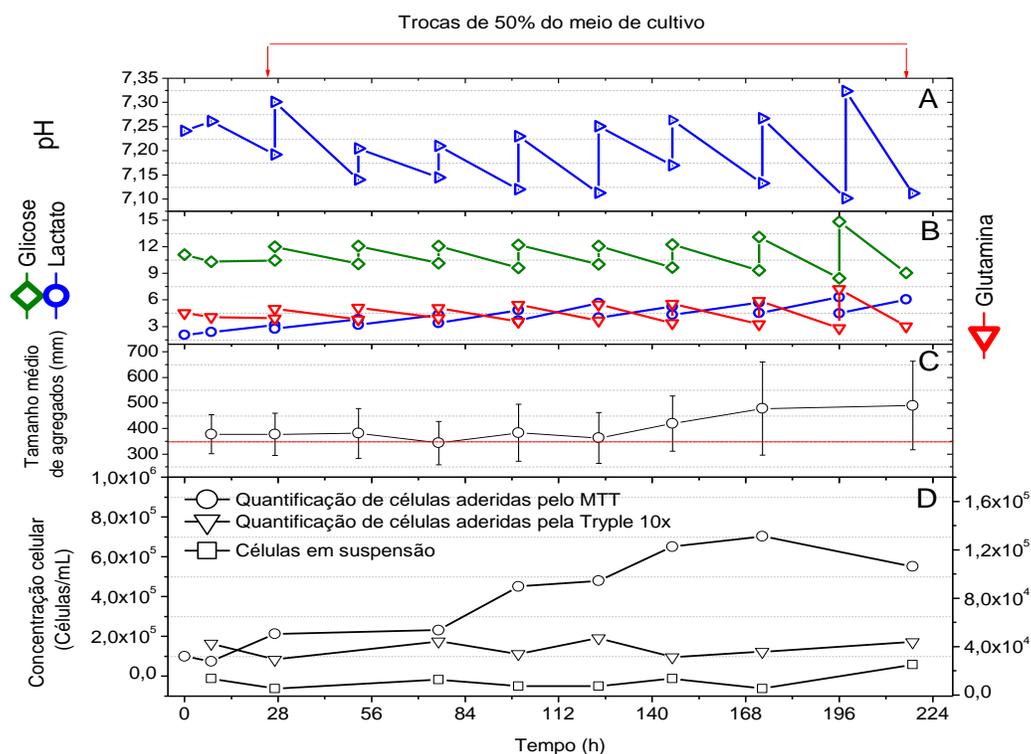


Para esta condição de velocidade de rotação (50 rpm) no BEVT1, um k_{La} de $0,900 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ foi encontrado, sendo ligeiramente baixo devido à pouca área superficial do líquido para difusão do oxigênio, em comparação a outros biorreatores como o tanque agitado. Em relação à tensão de cisalhamento média, obtida através

das correlações apresentadas no item 1.7.4, um valor de $0,01 \text{ N/m}^2$ foi encontrado. O θ_m foi de $53 \pm 1,63$ segundos através do método colorimétrico.

Durante o cultivo identificado como EEP2, realizado com CEMs-CU e 3 g/L de microcarregador MAG a 70 rpm, foi observado um comportamento parecido com ao obtido em EP1, caracterizado por um crescimento progressivo durante os primeiros 6 dias de cultivo, seguido de uma fase estacionária (Figura 33 D). A formação de agregados aconteceu após 144 horas, embora com tamanhos menores aos obtidos em EP1, devido à maior velocidade de rotação, atingido tamanhos médios máximos de $0,490 \pm 0,172 \text{ mm}$, como apresentado nas Figuras 33 C e 63, coincidindo com a queda da concentração de células viáveis recuperadas através do método enzimático.

Figura 33. Resultados do experimento EEP2 realizado no BEVT1 a 70 rpm, usando meio alfa MEM com 15% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inóculo de $1,25 \times 10^5$ células/mL em 3 g/L de microcarregador MAG. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE® Select (1X) e número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=3.



Nesse experimento foi obtida uma quantidade de células máxima de 7,01 e $1,22 \times 10^5$ células, pelo método MTT e processo de digestão enzimático, respectivamente, representando um fator de expansão máximo de 7,02 e uma taxa específica de crescimento máxima μ_{\max} de $0,0176 \text{ h}^{-1}$ durante a fase de expansão. A problemática da recuperação das células pelo método enzimático também foi evidente e demonstrou ser mais crítica neste experimento, devido a maiores períodos de exposição à enzima. Nas análises de concentração de nutrientes, os substratos glicose e glutamina atingiram valores mínimos de 5,37 e 2,09 mM, respectivamente, não ocorrendo esgotamento destes nem do resto de amino ácidos, em função das trocas diárias de 50 % do meio realizadas após cada 24 horas. Nessas condições de rotação também foi observada uma atividade glicolítica similar à obtida em EP1 ($Y_{\text{lac/gli}} = 1,28$), embora uma menor concentração de lactato (6,28 mM) foi atingida ao final do cultivo. O pH foi mantido entre 7,1 e 7,3 durante todo o cultivo.

A transferência de oxigênio e tensão de cisalhamento média foram ligeiramente superiores, de $0,920 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ e de 0,015 N/m, respectivamente, comparada ao EP1, já esperado devido à maior velocidade de rotação. Em relação às características de mistura avaliadas através do método colorimétrico, foi obtido um θ_m de $27 \pm 3,4$ segundos.

5.3.2 Experimentos para análise da performance do BEVT2 em cultivos de CEMs primárias

Com o objetivo de ter uma medida quantitativa do dano celular, foi utilizando o kit específico para detectar a enzima intracelular Lactato Desidrogenase (LDH), liberada no meio de cultura quando se apresenta rompimento da membrana celular. Para tal fim, testes prévios para a quantificação e avaliação da estabilidade da enzima contida em 15 % de SFB no meio de cultura à temperatura constante ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) foram realizados. Nos resultados pode ser observado um comportamento estável da enzima durante um período aproximado de uma semana (Figura 34A), de acordo com o encontrado na literatura para diferentes concentrações de SFB, como pode ser observado na Tabela 22 (GOERGEN; MARC; ENGASSER, 1993;

QUESNEY et al., 2001; RACHER; LOOBY; GRIFFITHS, 1990). Após esse período de tempo, de aproximadamente 200 horas, foi observada uma degradação da enzima mais pronunciada.

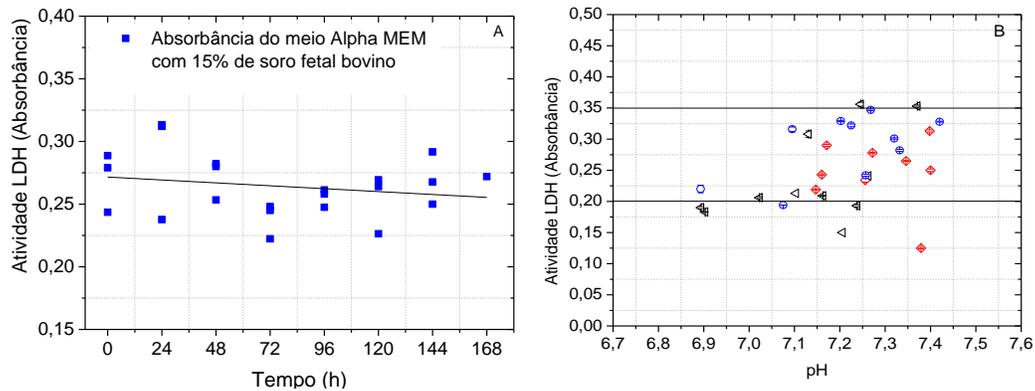
Tabela 22. Dados de absorvância de LDH obtidos do meio de cultivo alfa MEM a 5, 10 e 15% de SFB. As medições foram feitas em condições normais de cultivo, 37°C e 5% de CO₂, em frasco agitado.

| Tratamento amostra de Meio alpha Mem | Composição SFB | Absorvância |
|--------------------------------------|----------------|---------------------|
| | 5% | 0.075±0.005 (n=6)* |
| Amostras sem espuma | 10% | 0.143±0.002 (n=11)* |
| | 15% | 0.261±0.021 (n=9)** |

*Valores das médias ± Desvio padrão (número de observações cada uma realizada em triplicata); dados obtidos de (WOLTERBEEK; VAN DER MEER, 2005) com meio MEM; ** Dados obtidos neste trabalho.

Testes adicionais para verificar a variação da enzima LDH em diferentes pHs, considerando uma faixa comum em cultivo, foram também realizados para meios de cultivo preparados com diferentes lotes de SFB. Desta forma foram avaliadas 30 amostras de três meios de cultivo alfa MEM com 10 % de SFB em pH entre 6,7 e 7,5. Os resultados apresentados na Figura 34B, evidenciaram a variabilidade da medida com as mudanças de pH, sendo necessário para as próximas medidas, a consideração de mudanças drásticas do pH. Dessa forma, nos experimentos foi utilizada a média desses valores (0,275) para pHs entre 7,0 a 7,4, como base para evidenciar incrementos na atividade da enzima durante o cultivo.

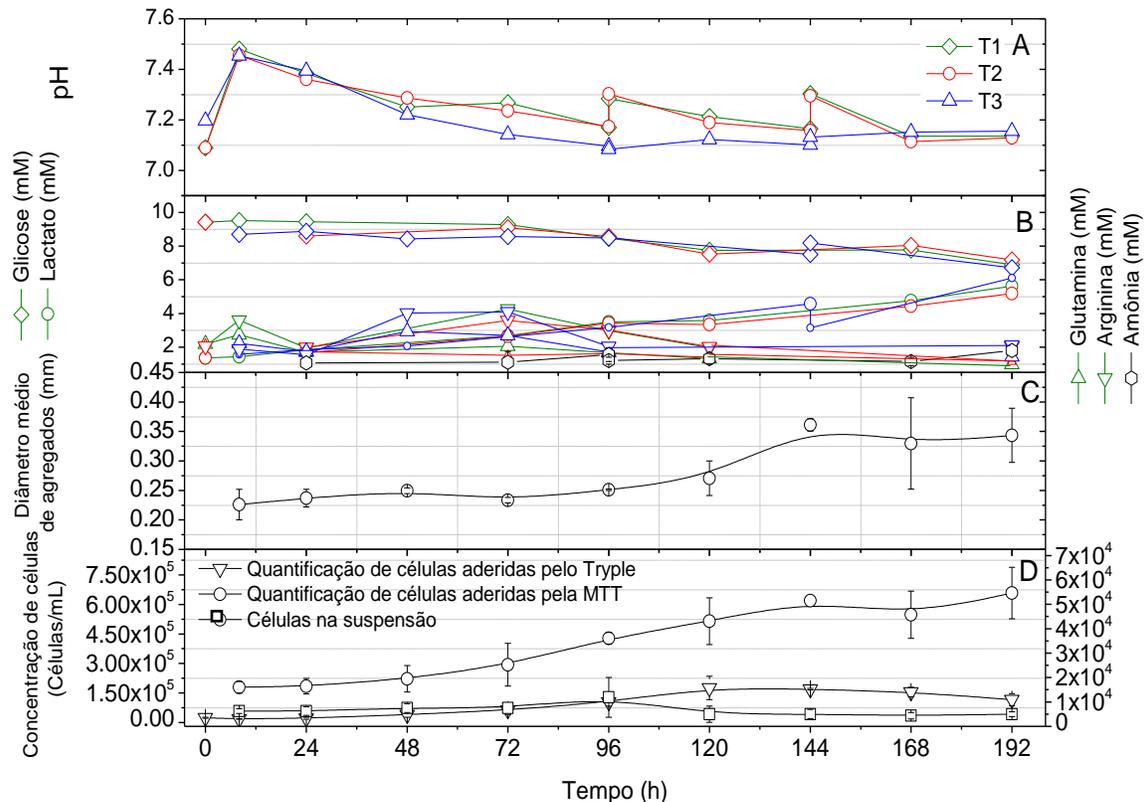
Figura 34. Variação da atividade da enzima LDH proveniente de 15 % de SFB em meio alfa MEM durante incubação a 37° C (A), e variabilidade da absorvância em diferentes condições de pH da enzima proveniente de meio alfa MEM com 10 % de SFB, n=30 (B).



Realizada esta avaliação, foi conduzido o seguinte grupo de experimentos, identificados na Tabela 16 como EBT1, no BEVT2, com volume de trabalho de 100 mL, realizados a 100 rpm. Estes experimentos foram realizados com células de cordão umbilical e concentrações de microcarregador Cultispher®S de 1 g/L. Durante o cultivo, como apresentado na Figura 35A, o pH atingiu valores acima de 7,3 nas primeiras horas de cultivo, o que pode ter causado uma fase lag mais longa como consequência de pHs maiores que 7,4 (Figura 35D), como observado por outros pesquisadores (MILLER; BLANCH; WILKE, 1988; OSMAN; BIRCH; VARLEY, 2001).

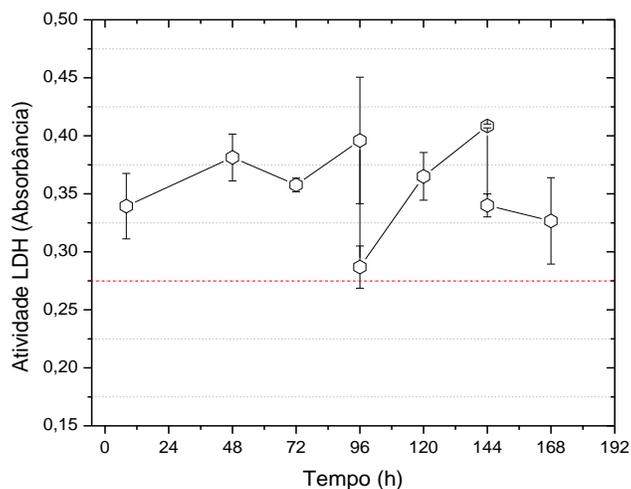
No entanto, foi observado um melhor crescimento, atingindo uma densidade de $6,58 \pm 1,30$ e $1,75 \pm 0,59 \times 10^5$ células/mL, representado um FE de 27,4 e 7,29, baseado na concentração do inóculo, e 3,69 e 10, baseado na concentração celular obtida as 8 horas, através do kit MTT e recuperação enzimática, respectivamente, e uma μ_{max} na fase de expansão de $0,019 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0,96$), considerando os resultados obtidos através da recuperação enzimática. Em relação ao metabolismo celular, foi observado que a concentração de glicose não apresentou valores abaixo de $6,90 \pm 0,23$ mM, e a concentração de lactato e amônia atingiram valores máximos de $5,62 \pm 0,45$ e 1,8 mM, respectivamente (Figura 35B). O rendimento aparente de lactato a partir da glicose ($Y_{lac/glic}$) foi de $2,01 \pm 0,01$.

Figura 35. Resultados do experimento EBT1 realizados no BEVT2 a 100 rpm, usando alfa MEM com 10 % de SFB, para cultivo de CEMs-CU com inóculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL e 1 g/L de microcarregador Cultispher®S. A) pH; B) concentração de glicose, glutamina, arginina e lactato; C) diâmetro médio de agregados e D) o número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT e método enzimático usando TrypLE®Select (1X), e o número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão com tripan, n=3.



A modulação no tamanho dos agregados, foi mantida aproximadamente estável, com um tamanho médio de $0,360 \pm 0,105$ mm durante as últimas 48 horas do cultivo. Embora uma velocidade de rotação de 100 rpm, maior que o N_{s1} (70 rpm), foi usada, a formação de agregados com tamanhos homogêneos foi favorecida (Figura 63), sem ser evidenciado um incremento na morte celular indicada pelo LDH como mostra a Figura 36, mantendo-se entre 0,27 e 0,4, para os três experimentos mesmo após a fase de adesão, a partir da qual a agitação permaneceu constante. Após as 96 horas, a atividade da enzima LDH teve um aumento possivelmente relacionado com desprendimento de células causado pela reativação da agitação após a troca de meio.

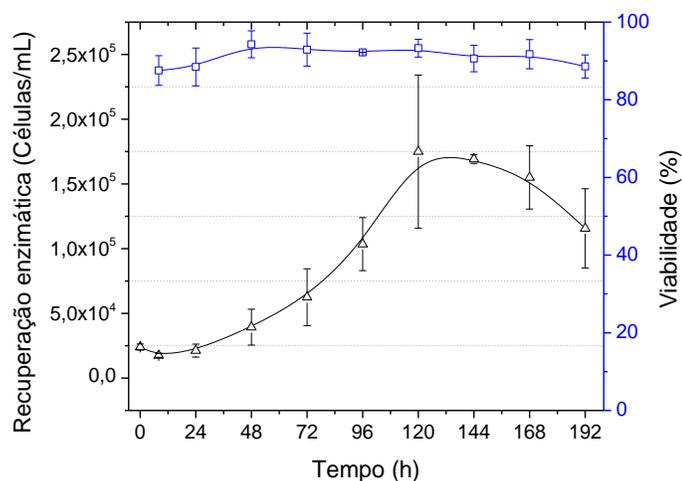
Figura 36. Resultados de determinação de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EBT1 realizado com CEMs-CU em triplicata no BEVT2 a 100 rpm. As quedas nos valores de absorbância são produto das trocas de meio de 50 % realizadas as 96 e 144 h. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, $n=3$.



Nestes experimentos, o processo de recuperação das células aderidas aos microcarregadores em cada ponto de amostragem foi dividido em duas partes: na primeira parte, a amostra foi ressuspensa em colagenase tipo I durante 5 minutos a 37 °C, e na segunda parte, após a retirada da colagenase por centrifugação a 400 g por 5 minutos, a amostra foi ressuspensa em TrypLE®Select (1X) durante 2 minutos à mesma temperatura, mantendo sempre um volume constante. Este procedimento foi eficiente durante as primeiras horas de cultivo, após as 120 horas, a formação de agregados dificultaram drasticamente a recuperação das células por digestão enzimática, mesmo possuindo tamanhos menores que 0,4 mm, provavelmente devido à densa matriz extracelular formada (Figura 63), sendo necessário aumentar o tempo de exposição à enzima, causando uma leve queda na viabilidade celular nas últimas horas do cultivo (Figura 37).

Nestas condições, a transferência de oxigênio no BEVT2 a 100 rpm avaliado com o k_{La} foi de $1,00 \pm 0,30 \text{ h}^{-1}$, um θ_m de $14 \pm 1 \text{ s}$ e uma tensão de cisalhamento média de $0,024 \text{ N/m}^2$.

Figura 37. Recuperação e viabilidade das CEMs-CU aderidas aos microcarregadores usando as enzimas collagenase tipo I e TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no BEVT2 a 100 rpm.



Os próximos experimentos, identificados como EFS1, foram realizados no frasco *Spinner* a 30 rpm, usando CEMs-CU e 1 g/L de microcarregador Cultispher®S. Nessas condições, foi atingida uma densidade celular de $1,68 (\pm 0,53) \times 10^5$ células/mL, representando um FE de $9,09 \pm 5,01$ e uma μ_{\max} de $0,012 \text{ h}^{-1}$, ($r^2=0,96$), considerando resultados obtidos através da recuperação enzimática. O pH do experimento foi mantido entre 6,8 e 7,4 (Figura 38A). Apesar da formação de agregados heterogêneos após as 96 horas (Figura 38C e 39), o aumento da atividade da enzima LDH foi observada a partir das 72 horas, e foi gradualmente aumentando até atingir um valor máximo de 0,5 (Figura 40). No final do experimento foi atingido um tamanho de agregados máximo médio de $0,750 \pm 0,315 \text{ mm}$ (Figura 38C).

Em relação ao metabolismo celular, a concentração de glicose mínima atingida foi de $7,03 \pm 0,46 \text{ mM}$, e a concentração de lactato e amônia apresentaram valores máximos de $6,53 \pm 1,17$ e $1,36 \pm 0,17 \text{ mM}$, respectivamente (Figura 38B). O rendimento aparente de lactato a partir da glicose ($Y_{\text{lac/glic}}$) estimado foi de $1,73 \pm 0,14$ durante o cultivo. Na recuperação através do processo de digestão enzimática, verificou-se uma queda gradual na viabilidade após as 96 h, como é apresentado na Figura 41, devido à formação de agregados.

Figura 38. Resultados do experimento EFS1 realizado no frasco *Spinner* a 30 rpm, usando meio alfa MEM com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inoculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 1 g/L de microcarregador Cultipher®S. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=3. Trocas de meio de 25 e 50 % foram realizadas as 96 e 144 h, respectivamente.

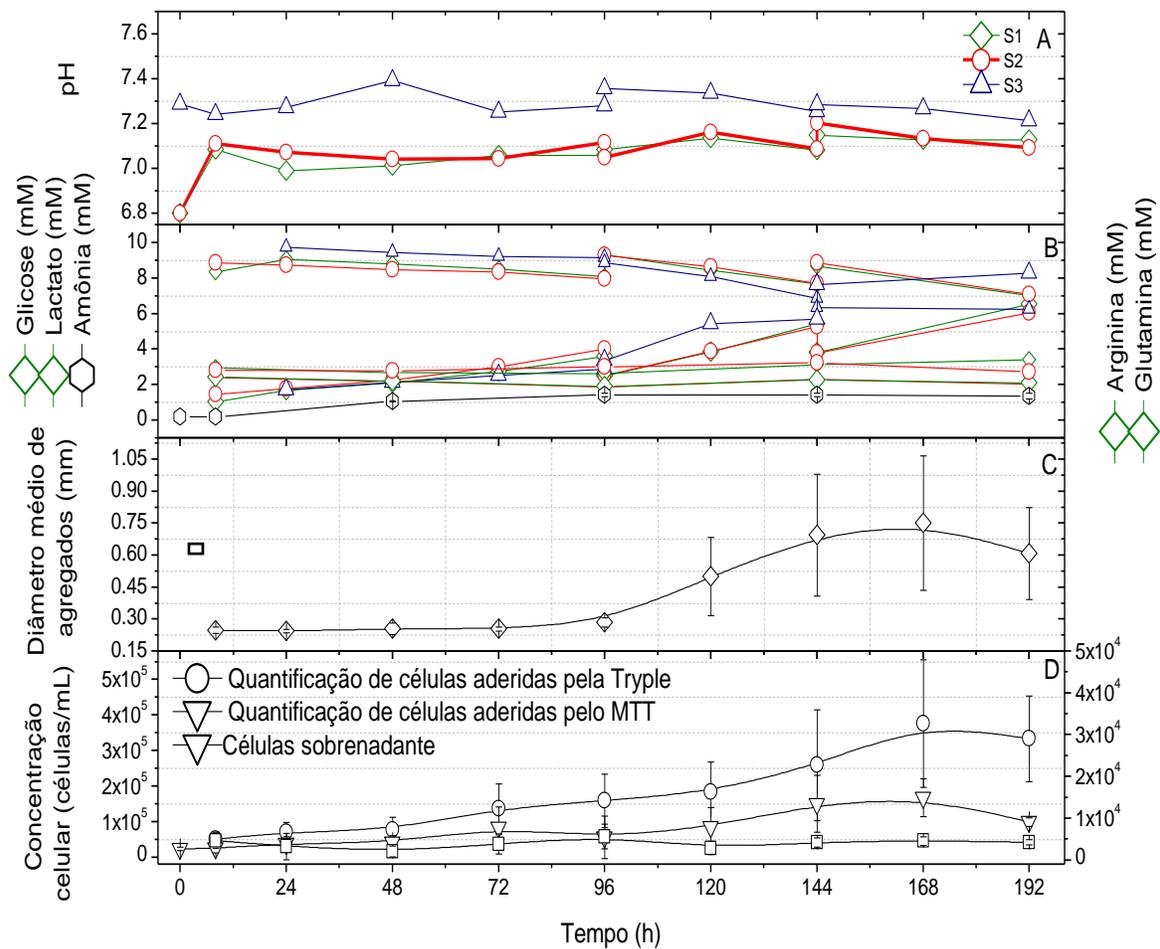


Figura 39. Imagem dos agregados de microcarregadores-células apresentados às 268 h de cultivo no frasco *Spinner* a 30 rpm com CEMs-CU aderidas a microcarregador Cultispher®S.

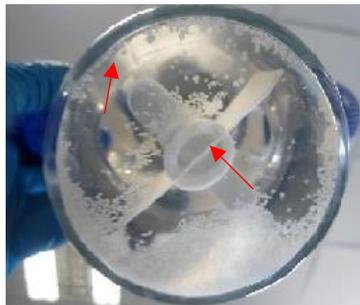


Figura 40. Resultados da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EFS1 realizado com CEMs-CU em triplicata no frasco *Spinner* a 30 rpm. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, n=3.

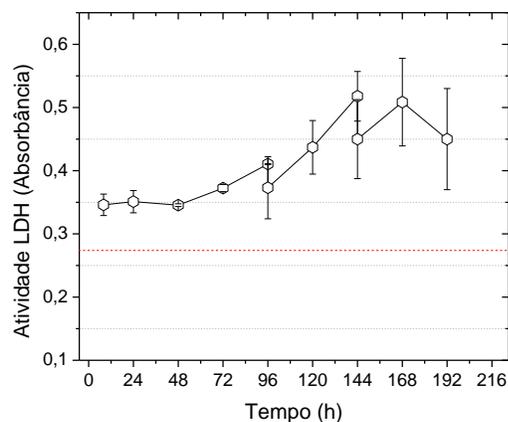
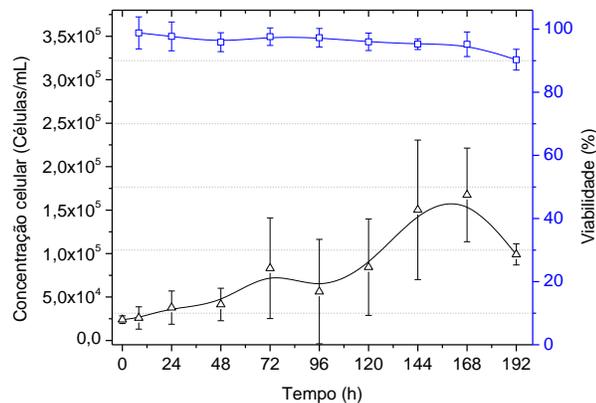
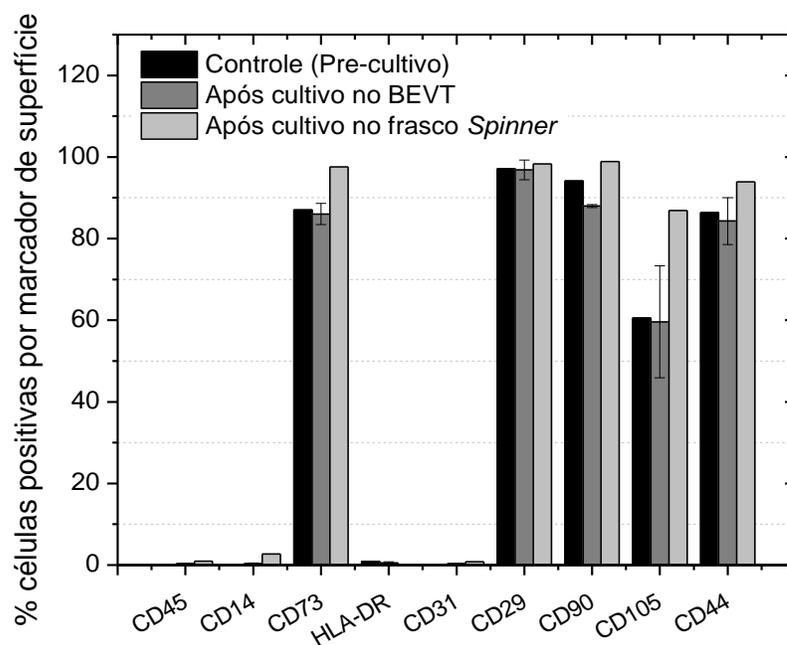


Figura 41. Recuperação e porcentagem de viabilidade das CEMs-CU aderidas aos microcarregadores usando a enzima TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no *Spinner* a 30 rpm.



No que se refere à caracterização das células, após o cultivo no BETV2 e no frasco *Spinner* a 100 e 30 rpm, respectivamente, a análise de citometria de fluxo de para a verificação da manutenção dos marcadores de superfície, é apresentada na Figura 42. Entre os marcadores mais importantes avaliados são destacados o CD90, CD44, CD29, CD73 e CD105, mostrando pouca alteração e até aumento da porcentagem, no caso das CEMs cultivadas em *Spinner*, comparados com às CEMs pré-cultivo.

Figura 42. Resultados em porcentagem dos marcadores de superfície por citometria de fluxo das CEMs-CU recuperadas dos experimentos do grupo PC1, realizados a 100 e 30 rpm no BEVT2 e no frasco *Spinner*, respectivamente.



O potencial de diferenciação nas três linhagens: osteócitos, condrócitos e adipócitos das CEMs pré e pós-experimento também foi avaliado como apresentado nas Figuras 43 a 45. No entanto, a diferenciação em adipócitos, caracterizada pela aparição de gotículas de gordura das CEMs cultivadas nos dois biorreatores foi baixa, isto devido, possivelmente, ao alto cisalhamento causado no processo de recuperação final realizado no frasco *Spinner* a 120 rpm ($4 \times N_{s1}$), em ambos os casos, ainda menor que o recomendado por outros pesquisadores, de $5 \times N_{s1}$, para auxiliar o processo de recuperação celular (NIENOW et al., 2014). Em contrapartida,

a diferenciação em osteócitos, evidente pelo acúmulo de oxalato de cálcio, e condrócitos, com a coloração do azul de alciano dos proteoglicanos, não mostraram diferenças comparadas com as CEMs pré-cultivo.

Figura 43. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU antes do cultivo em biorreator.

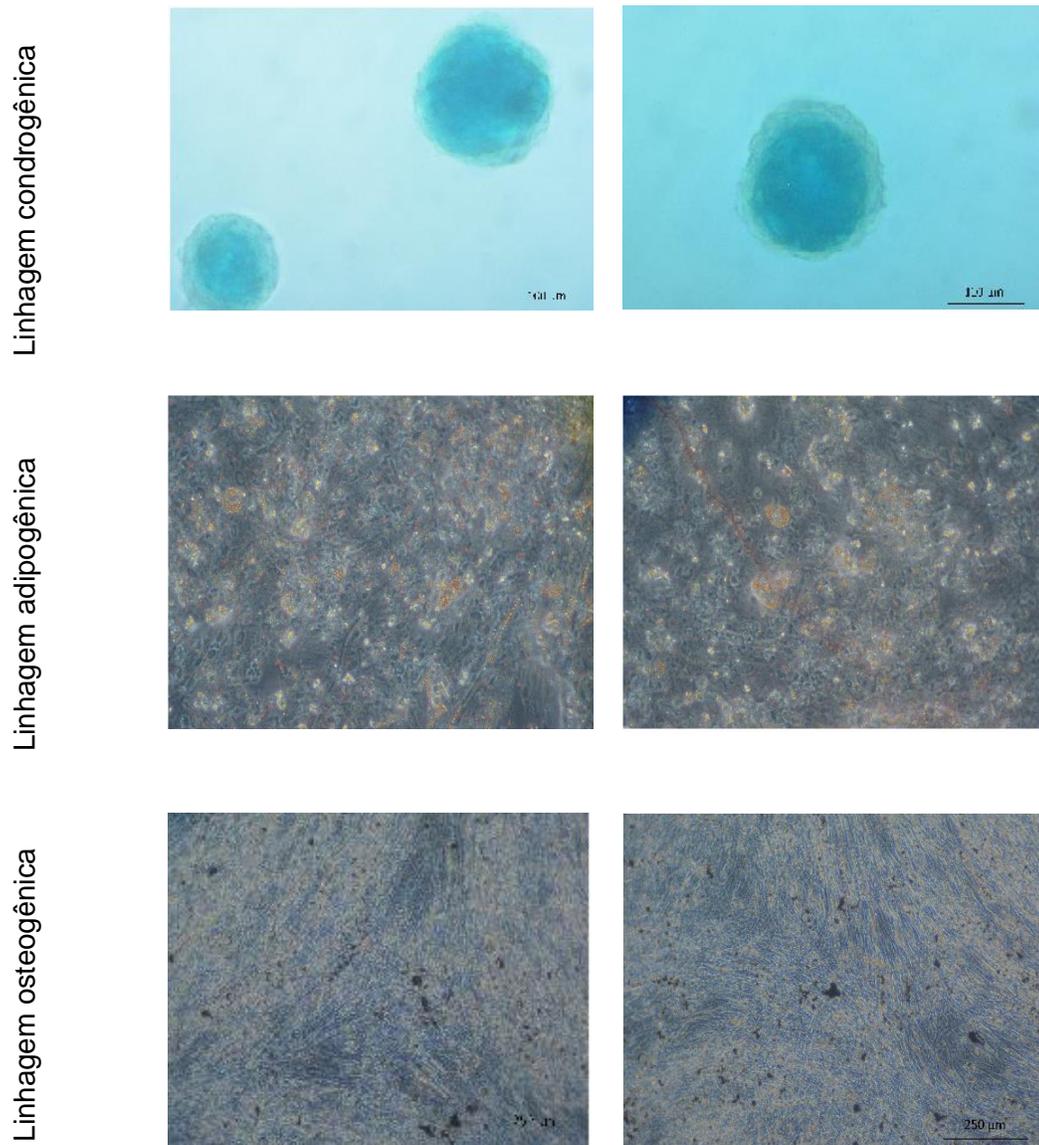


Figura 44. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU recuperadas de dois experimentos realizados com CEMs de cordão umbilical a 100 rpm no BEVT2 (EBT1).

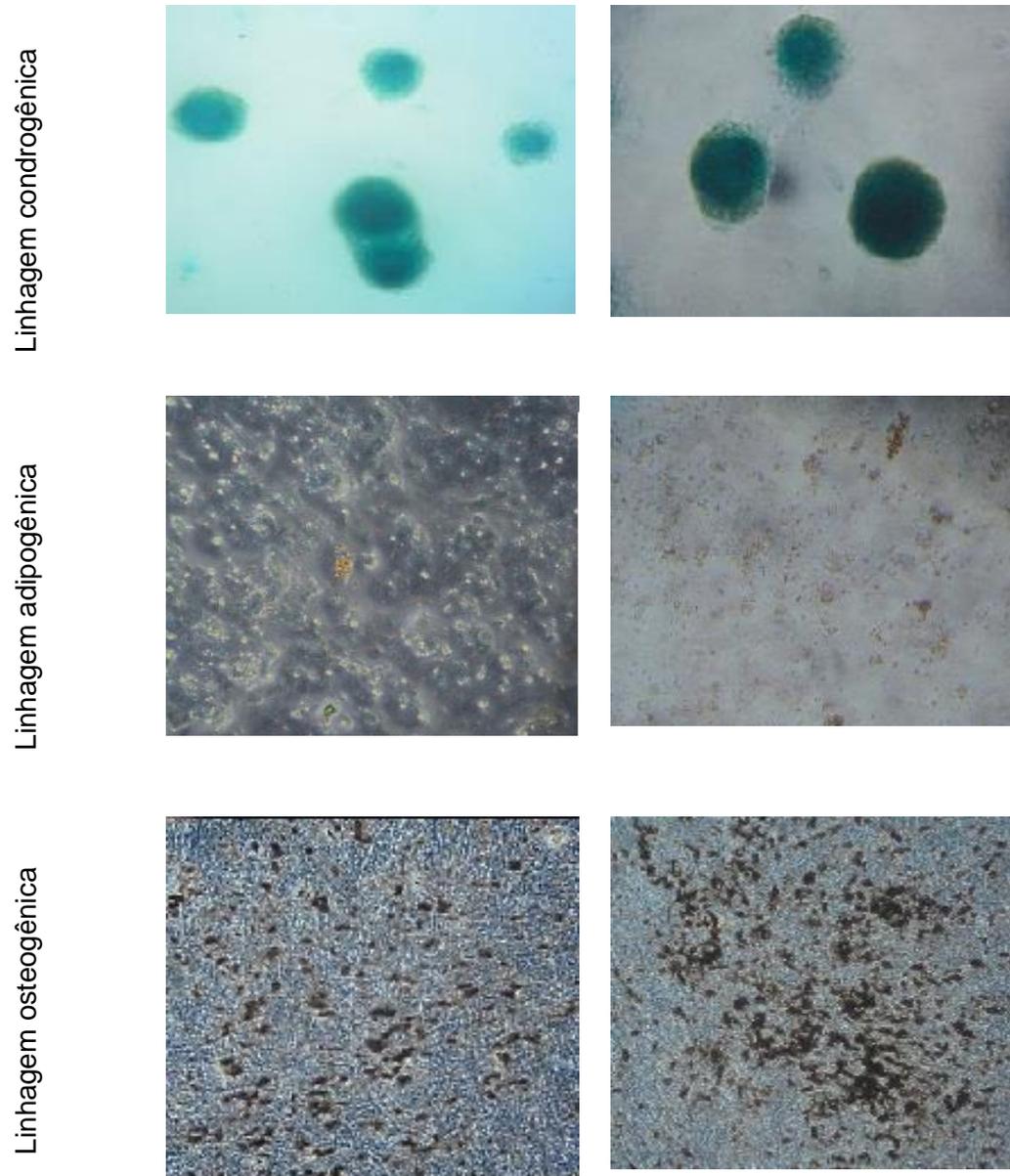
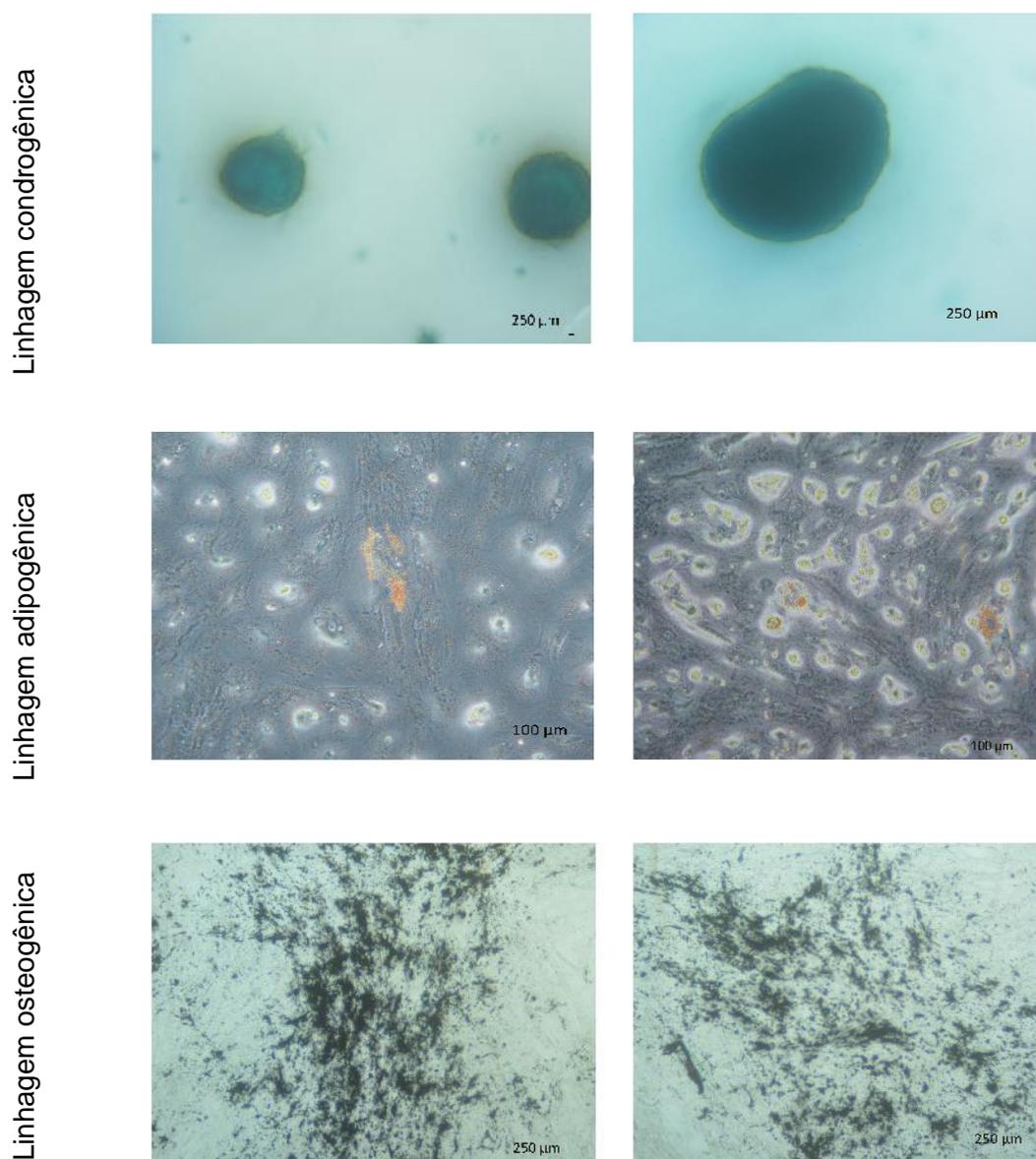


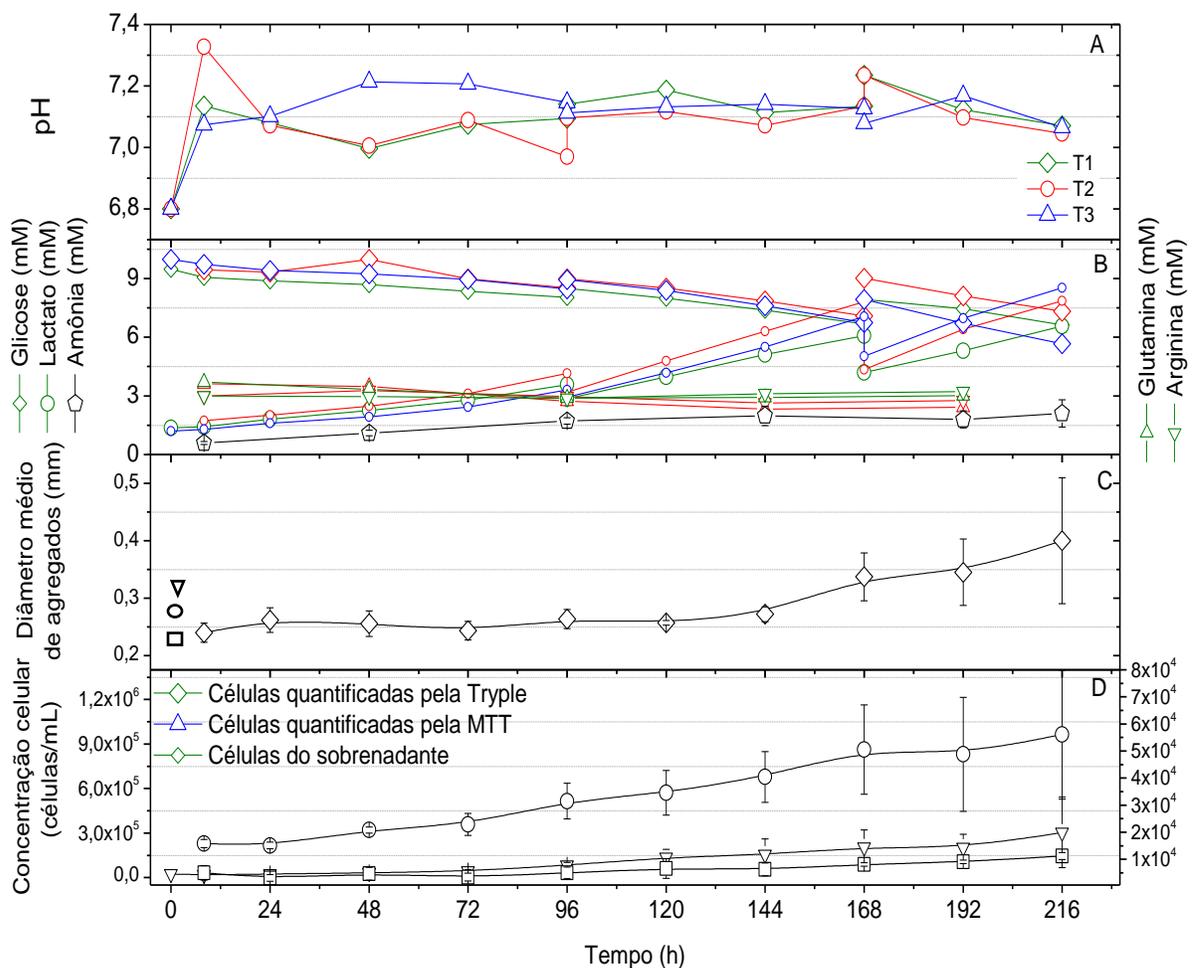
Figura 45. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU recuperadas dos experimentos realizados com CEMs de cordão umbilical a 30 rpm no *Spinner* (EFS1).



No grupo de experimentos identificados como EBT2, realizados também no BEVT2, foram usadas CEMs de cordão umbilical e tecido adiposo e 3 g/L de Cultispher®S. Estes experimentos foram realizados considerando o critério de suspensão N_{s1} (90 rpm). Nos experimentos das CEMs de cordão umbilical, o pH foi mantido em uma faixa entre 6,8 e 7,37, possível através da manipulação do CO_2

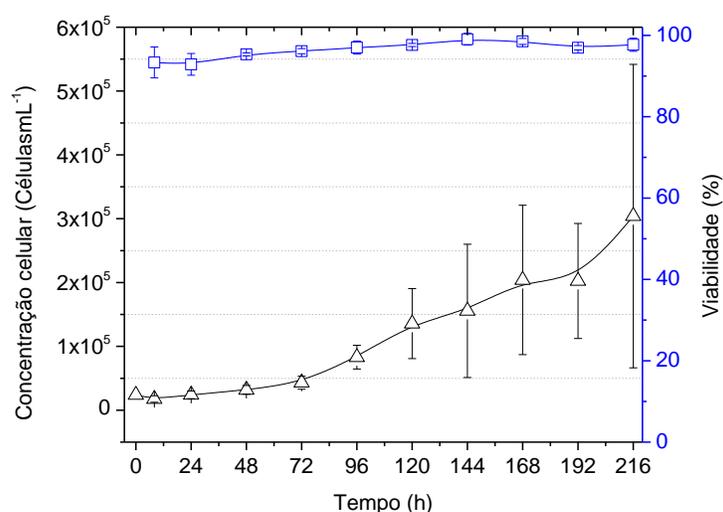
(Figura 46A). Em termos de metabolismo, a concentração de glicose mínima atingida foi de $6,62 \pm 1,09$ mM, e a produção máxima de lactato e amônia foram de $7,85 \pm 1,0$ e $2,1 \pm 0,69$ mM, respectivamente (Figura 46B). A concentração de nutrientes e diluição de metabólitos tóxicos foi mantida pelas trocas de 25 e 50 % de meio as 96 e 168 horas, respectivamente. O rendimento aparente de lactato estimado a partir da glicose ($Y_{lac/glic}$) foi de $1,80 \pm 0,44$ durante o cultivo.

Figura 46. Resultados do experimento EBT2 realizado no BEVT1 a 90 rpm, usando meio alfa MEM com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inoculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 3 g/L de microcarregador Cultipher®S. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=8.



Neste experimento foi atingida uma densidade celular máxima de $9,63 \pm 4,33$ e $3,04 \pm 2,37 \times 10^5$ células/mL, representando um FE de 43,16 e 12,6, baseado na concentração do inóculo, e de 4,15 e 17,3 baseado na concentração de células obtidas às 8 horas, através do kit MTT e recuperação enzimática, respectivamente (Figura 46D), e uma μ_{\max} de $0,014 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0,95$) na fase de expansão, considerando os dados da recuperação enzimática. A viabilidade foi mantida acima de 95 % durante todo o experimento (Figura 47).

Figura 47. Recuperação (eixo esquerdo) e viabilidade (eixo direito) das CEMs-CU recuperadas pelo processo de digestão enzimática usando a TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no BEVT realizado a 90 rpm.



Após as 120 horas, notou-se um incremento de no tamanho dos agregados que veio acompanhado pelo aumento da atividade da enzima LDH (Figura 48). Uma frequência de apenas 20 % de agregados com tamanhos menores que 0,3 mm foi obtida às 216 horas (Figura 49), tempo em que foi atingido um tamanho de agregados máximo médio de $0,399 \pm 0,109$ mm (Figura 46C). Amostras de MEV dos agregados formados durante o cultivo as 0, 96, 168 e 216 horas são apresentados na Figura 50.

Figura 48. Resultados de determinação de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EBT2 realizado com CEMs-CU em triplicata no BEVT2 a 90 rpm. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, $n=3$.

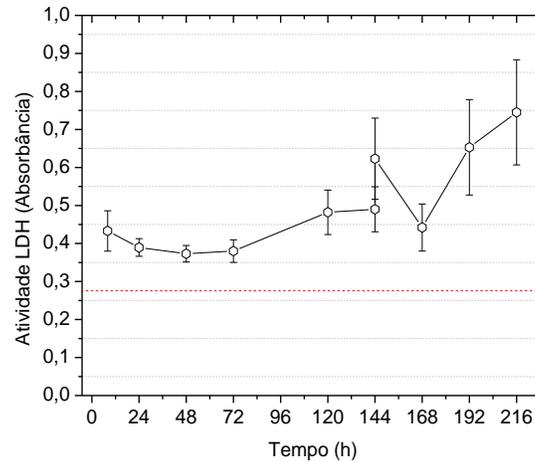
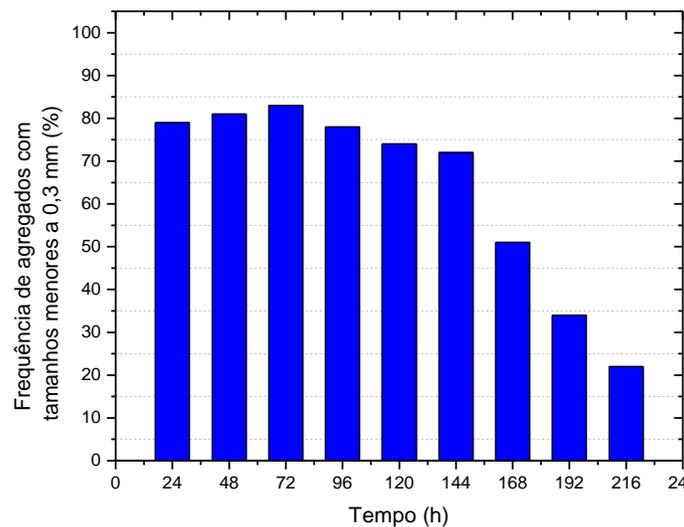
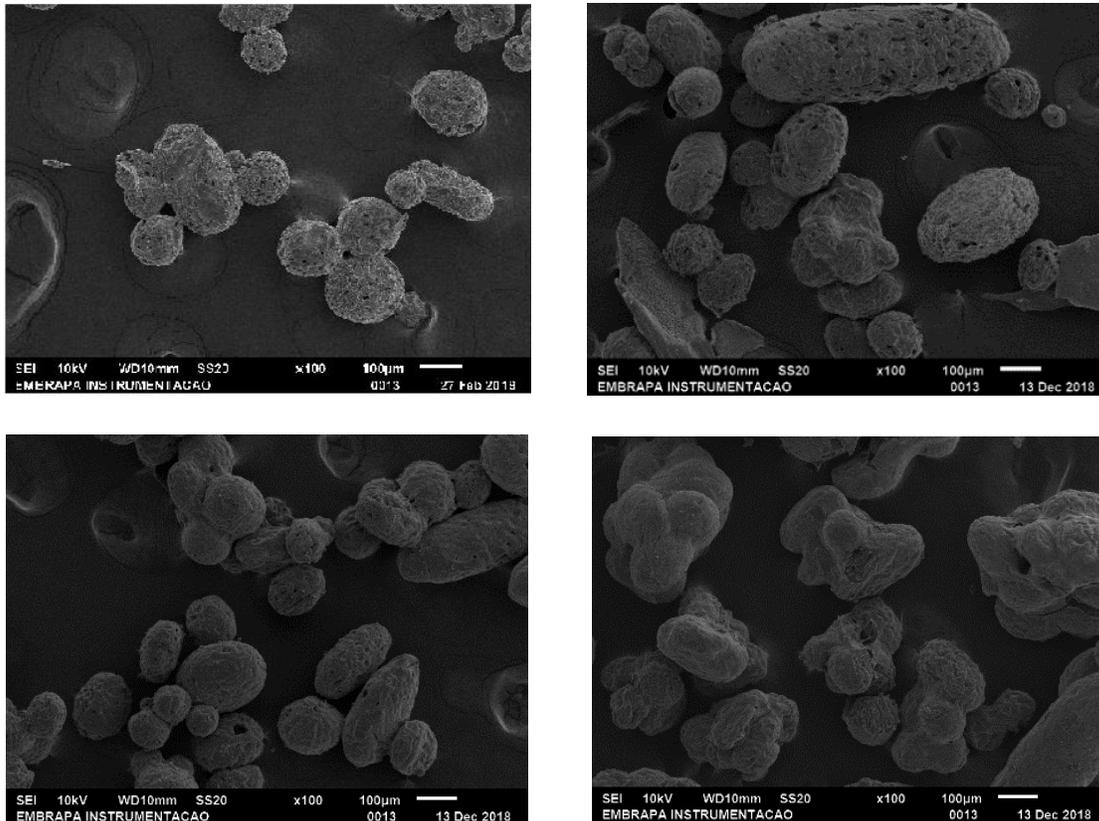


Figura 49. Frequência de agregados com tamanhos menores a 0,3 mm durante o experimento EBT2 realizado com CEMs-CU em triplicata no BEVT2 a 90 rpm, $n=100$.



No final do experimento, utilizando agitação (90 rpm) no BEVT para facilitar a digestão enzimático usando TrypLE®Select (10X) durante cerca de 15 minutos, foi obtida uma densidade de $1,38 \pm 0,09 \times 10^6$ células/mL, equivalente a $1,34 \pm 0,09 \times 10^8$ células totais. Nessas condições de rotação (90 rpm), foram obtidos um θ_m de 14 s, um kLa de $0,94 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ e uma tensão de cisalhamento média de 0,021 N/m.

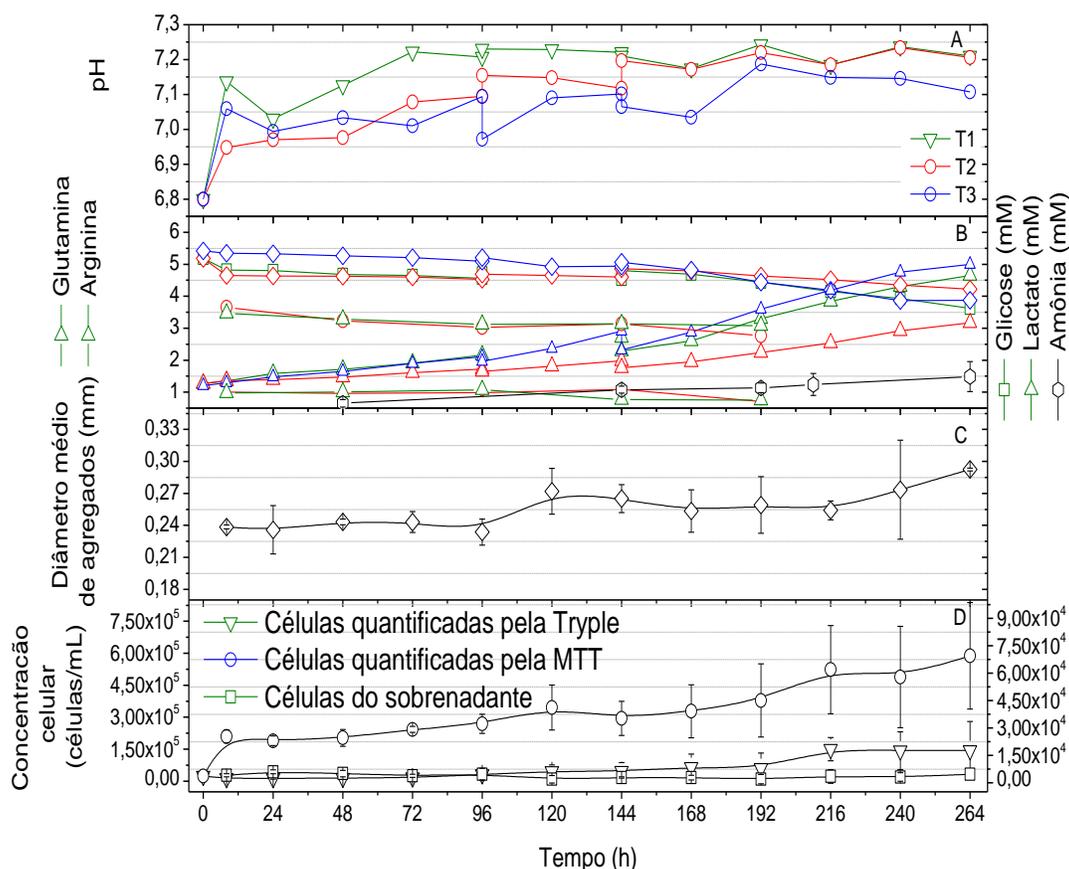
Figura 50. Imagens de MEV coletadas durante os experimentos realizados no BEVT2 a 90 rpm com CEMs-CU aderidas a microcarregador Cultispher®S. As imagens foram coletadas durante as 0, 96, 168 e 216 horas. A primeira imagem apresenta microcarregadores Cultispher®S antes do experimento. Magnificação de 100x.



Os próximos experimentos realizados nas mesmas condições de rotação, concentração de microcarregadores e de células que o anterior, foi realizado com CEMs-TA. Apesar que o pH durante o experimento foi mantido entre 6,8 e 7,25 (Figura 51A), o crescimento foi mais lento, comparado com os resultados do cultivo das CEMs-CU, atingindo concentrações máximas de $5,88 \pm 2,50$ e $1,49 \pm 0,54 \times 10^5$ células/mL, representando um FE de $23,1 \pm 5,85$ - $6,24 \pm 5,53$, baseado na concentração do inóculo, e de $2,83 \pm 0,24$ e $13,93 \pm 6,77$, baseado na concentração de células obtidas às 8 horas, pelo método MTT e por digestão enzimática, respectivamente (Figura 51D). A viabilidade das células recuperadas através do

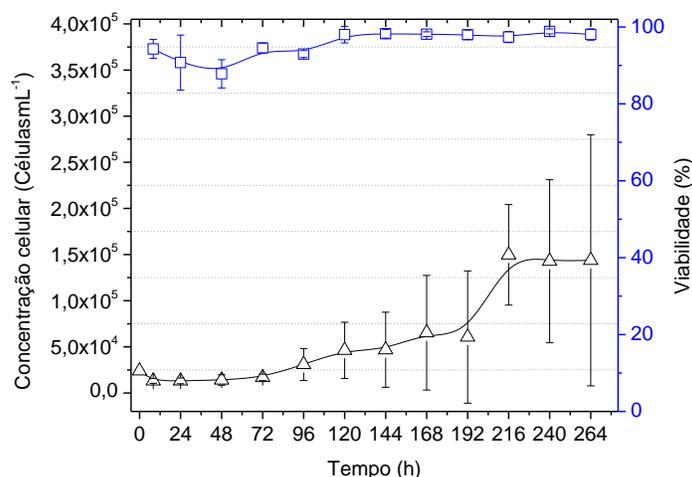
processo de digestão enzimática, foi mantida acima de 90 % durante todo o experimento (Figura 52).

Figura 51. Resultados do experimento EBT2 realizado no BEVT2 a 90 rpm, usando meio alfa MEM com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-TA com inoculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 3 g/L de microcarregador Cultipher®S. A) pH; B) diâmetro médio de agregados; C) concentração de glicose, glutamina e lactato e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células aderidas pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=8.



Em termos de metabolismo, a concentração de glicose mínima atingida foi de $3,62 \pm 0,35$ mM, e a produção máxima de lactato e amônia foram de $4,65 \pm 0,97$ e $1,48 \pm 0,47$ mM, respectivamente (Figura 51B). A concentração de nutrientes e diluição de metabolitos tóxicos foi mantida pelas trocas de 25 e 50 % de meio as 96 e 144 horas, respectivamente. O rendimento aparente de lactato a partir da glicose ($Y_{lac/glic}$) estimado foi de $3,00 \pm 0,26$ durante o cultivo.

Figura 52. Recuperação e porcentagem de viabilidade das CEMs-AT aderidas aos microcarregadores usando a enzima TrypLE®Select (1X) durante o cultivo no BEVT realizado a 90 rpm.



A formação de agregados também foi mais lenta, mantendo tamanhos entre 240 e 270 μm até as 120 horas. Posteriormente, foi observado um leve incremento atingido um valor médio de $0,292 \pm 0,013 \mu\text{m}$ (Figura 51C), acompanhada por um progressivo aumento na atividade da enzima LDH (Figura 53). Uma frequência 60 % de agregados com tamanhos menores a 0,3 mm foi obtida no final do experimento (Figura 54).

Figura 53. Resultados de determinação de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicadora de lise celular durante experimento EBT2 realizado com CEMs-TA em triplicata no BEVT2 a 90 rpm. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula, $n=3$.

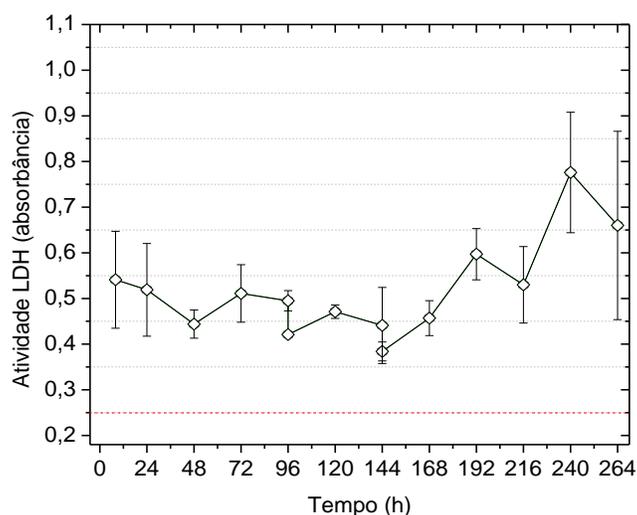
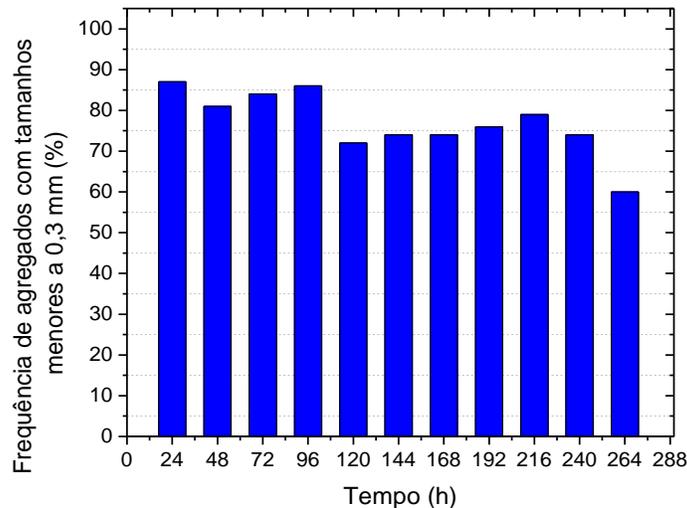
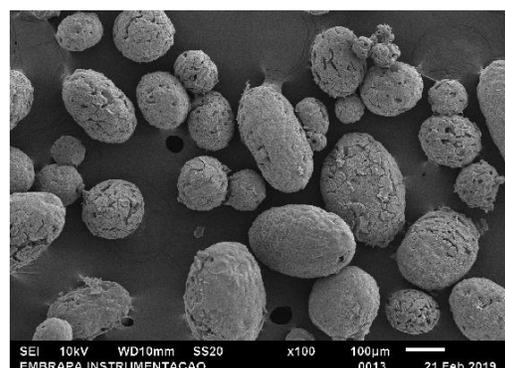
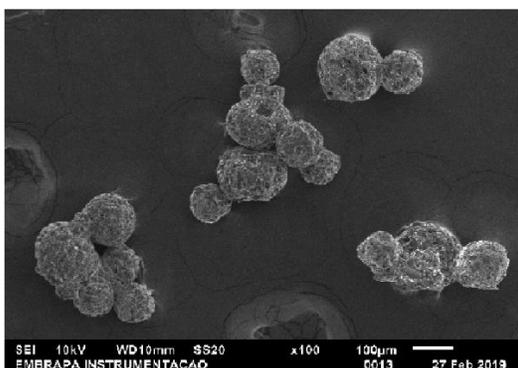


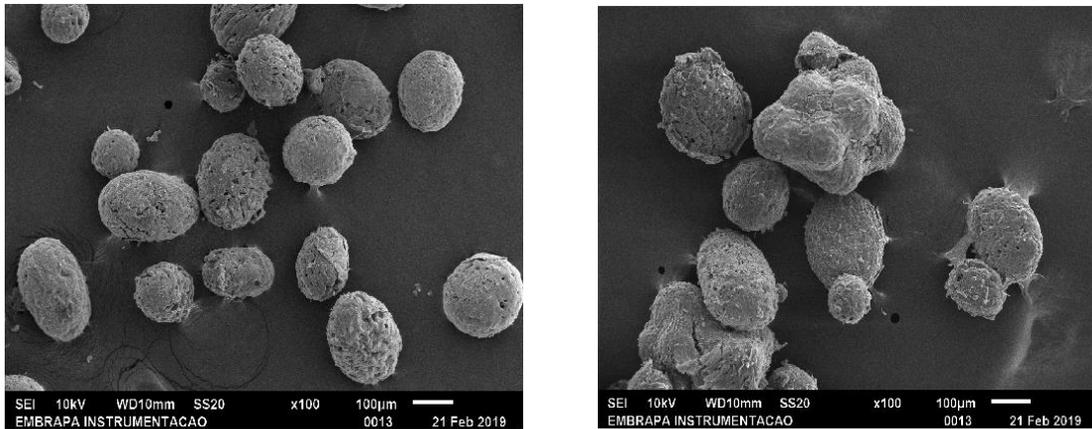
Figura 54. Frequência de agregados com tamanhos menores a 0,3 mm, durante o experimento realizado com CEMs-TA, em triplicata no BEVT2 a 90 rpm, n=100.



Amostras de MEV dos agregados formados durante o cultivo as 96, 168 e 216 horas são apresentadas na Figura 55. Ao final do experimento uma densidade de $1,10 \pm 0,025 \times 10^6$ células/mL, equivalente $1,08 \pm 0,19 \times 10^8$ células totais foram recuperadas usando uma agitação (90 rpm) no BEVT junto com o tratamento enzimático durante 15 minutos.

Figura 55. Imagens de MEV coletadas durante os experimentos realizados no BEVT2 a 90 rpm com CEMs-TA aderidas a microcarregador Cultispher®S. As imagens foram coletadas durante as 0, 96, 168 e 264 h. A imagem superior esquerda apresenta microcarregadores Cultispher®S antes do experimento. Magnificação de 100x.





Nas análises imunofenotípicas desses experimentos, tanto as CEMs-TA como as CEMS-CU apresentaram elevada expressão dos marcadores CD90, CD73, CD29, CD44 e CD105 comparadas com o controle, assim como baixa ou ausente expressão dos marcadores endoteliais CD31, antígenos HLA-DR e CD14 (Figura 56). A diferenciação em multilinhagem (adipócitos, osteócitos e condrócitos) avaliada para as CEMs-CU e as CEMS-AT pós-cultivo, também mostrou a manutenção do seu potencial como observado na Figura 57 e 58, respectivamente.

Figura 56. Resultados em porcentagem dos marcadores de superfície por citometria de fluxo das CEMs-CU e TA recuperadas dos experimentos do grupo PC2 realizados no BEVT2.

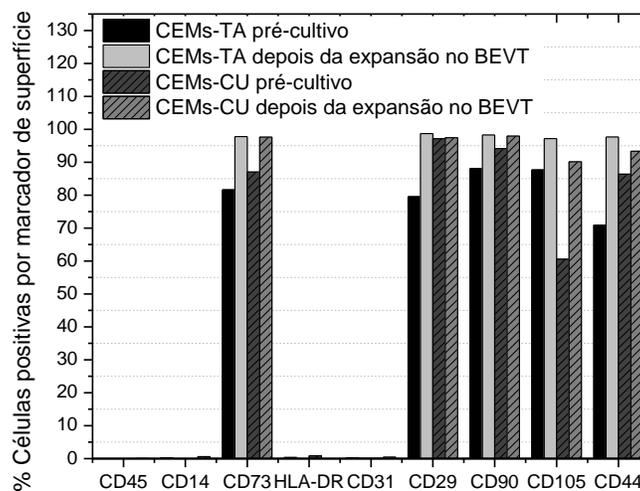


Figura 57. Resultados da diferenciação celular das CEMs-CU recuperadas dos experimentos realizados com CEMs de tecido adiposo a 90 rpm no BEVT2 (EBT1).

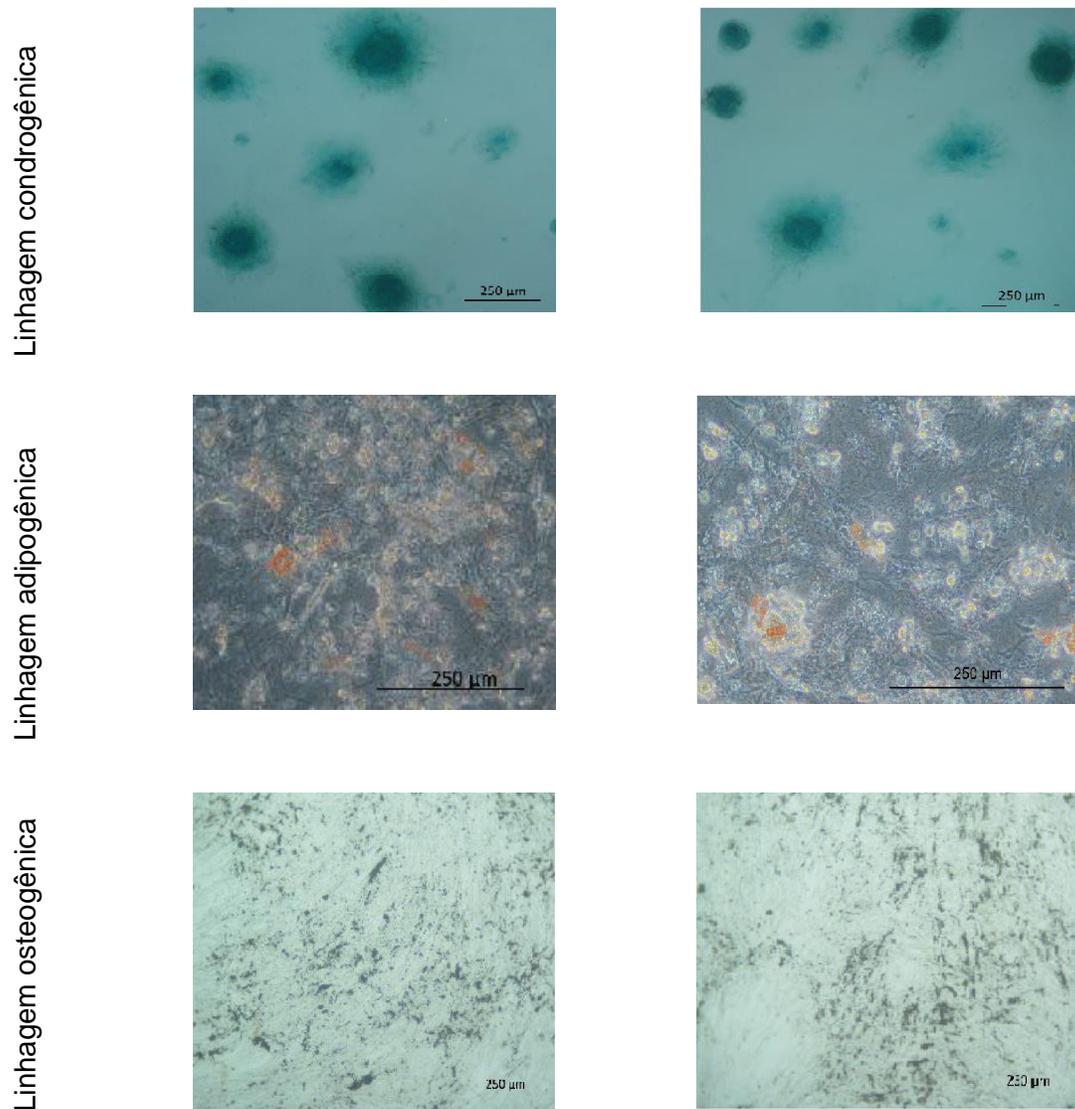
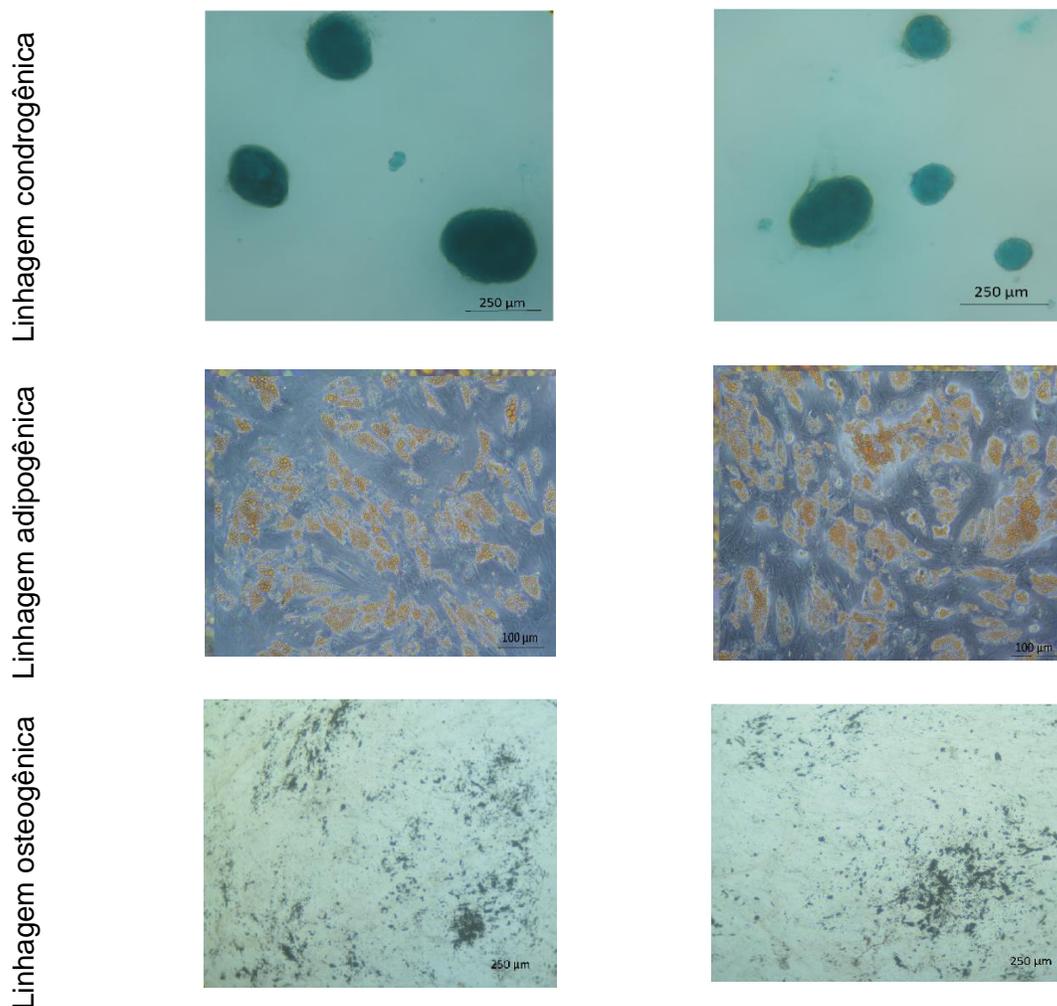


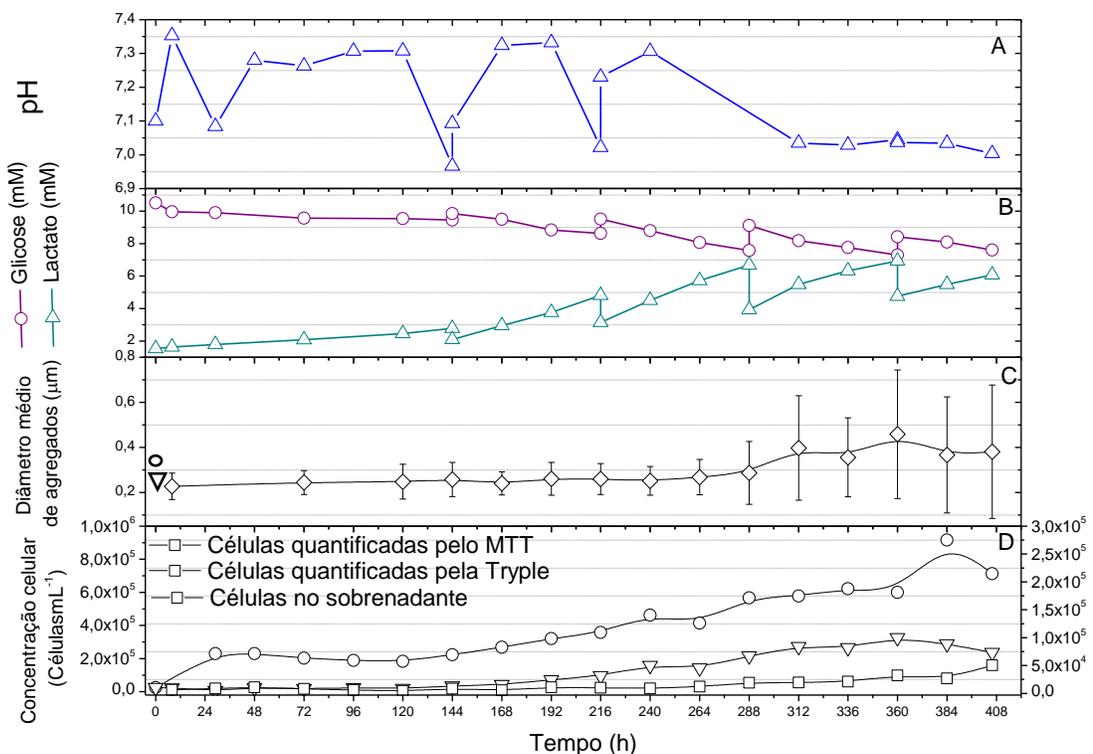
Figura 58. Resultados da diferenciação celular das CEMs-TA recuperadas dos experimentos realizados com CEMs de cordão umbilical a 90 rpm no BEVT2 (EBT2).



Finalmente, um último experimento de cultivo identificado como EFS2, foi realizado no frasco *Spinner*, a uma velocidade de agitação de 30 rpm, com CEMs de cordão umbilical e uma concentração de 3 g/L de microcarregador Cultispher® S. Este experimento com uma duração de 17 dias foi caracterizado por uma longa fase lag, a pesar da manutenção do pH em níveis adequados, entre 6,9 e 7,4 (Figura 59A). Durante a fase de expansão foi obtido um μ_{max} de $0,0167 \text{ h}^{-1}$ e um fator de expansão de 14,8 e uma produção celular máxima de $3,26 \times 10^7$ e de $3,09 \times 10^7$ células, através do método enzimático e MTT, respectivamente, como pode ser

observado na Figura 59D. Embora tenha sido utilizada uma baixa velocidade de agitação, foi observada maior quantidade de células no sobrenadante durante o cultivo, quando comparado aos experimentos realizados no BEVT2.

Figura 59. Resultados do experimento de cultivo realizado no frasco *Spinner* a 30 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 10% v/v de SFB, para cultivo com CEMs-CU com inóculo de $2,4 \times 10^4$ células/mL em 3 g/L de microcarregador Cultispher® S. A) pH; B) concentração de glicose e lactato; C) diâmetro médio de agregados e D) número de células aderidas aos microcarregadores obtido pelo MTT, número de células pelo método enzimático usando TrypLE®Select (1X) e o número de células livres (em suspensão) obtidos pelo método de exclusão do corante azul de tripan, n=8.



Em relação ao consumo de glicose e glutamina, foram atingidos valores de concentração mínimos de 6,71 e 1,44 mM, respectivamente, em função das trocas de meio de cultivo. Quanto à produção de lactato e amônia, foram atingidas concentrações máximas de 6,1 e 0,98 mM, respectivamente (Figura 59B).

A quantificação da enzima LDH permaneceu estável, com valores de absorvância entre 0,35 e 0,4, até as 300 horas de cultivo. Após este período um

aumento progressivo foi observado (Figura 60), devido à formação de agregados grandes e heterogêneos, como é apresentado na Figura 61 e 63.

Figura 60. Resultados da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) como indicador de lise celular no experimento PC2 realizado com CEMs-CU no frasco *Spinner* de 100 mL a 30 rpm. A linha vermelha indica o valor da média da atividade da enzima LDH do meio de cultivo suplementado com 10 % de SFB sem célula.

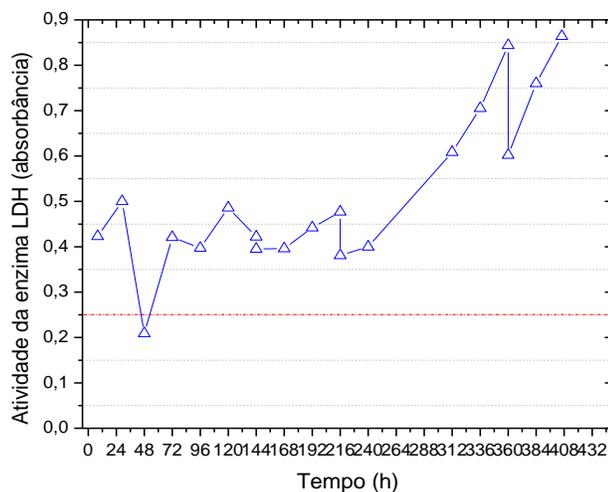
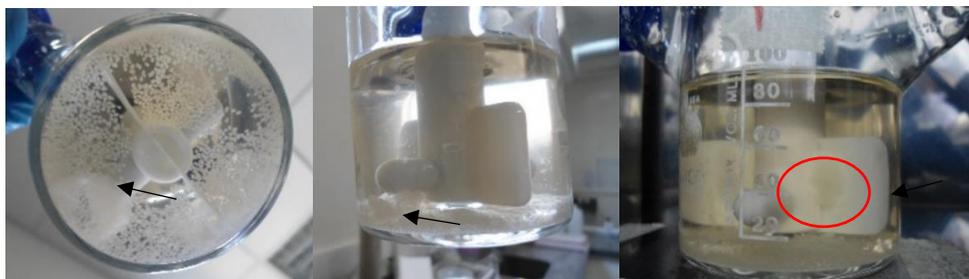
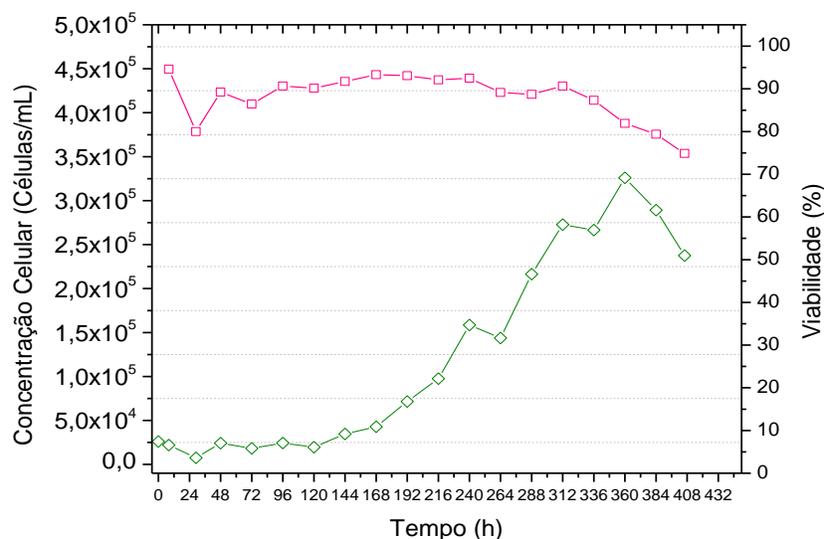


Figura 61. Formação e deposição de agregados de microcarregadores colonizados com CEMs durante o cultivo em frasco *Spinner* de 100 mL a 30 rpm de CEMs-CU a partir das 268 h de cultivo. As setas pretas mostram a formação de agregados grandes, alguns deles depositados nas pás do impelidor como apresentado pela elipse vermelha.



A excessiva agregação demandou um aumento do tempo de exposição à enzima no processo de recuperação e, conseqüentemente, uma diminuição na porcentagem da viabilidade de até 75% a partir das 240 horas de cultivo, como apresentado na Figura 62.

Figura 62. Resultados de recuperação celular obtidos com o uso da enzima dissociativa TrypLE®Select (1X) do experimento realizado com CEMs-CU em frasco *Spinner* de 100 mL a 30 rpm.



Um resumo de todas as condições e resultados obtidos nos cultivos e medidas hidrodinâmicas, são apresentados na Tabela 23.

Na avaliação inicial da expansão de CEMs no BEVT1, com uma condição de rotação menor do critério N_{s1} (50-70 rpm), foi verificado o impacto da formação de grandes e heterogêneos agregados (>0,4 mm), promovido pela baixa velocidade de agitação, que dificultaram a quantificar do crescimento celular através do processo de digestão enzimática, como mencionado também em outros estudos (CARUSO et al., 2014; MIZUKAMI et al., 2016), sendo possível obter dados de crescimento somente a partir da técnica com o uso do kit MTT. Em contraste, nos experimentos EBT1 e EBT2, realizados com as CEMs-CU e TA, em condições de rotação maiores ou iguais as do N_{s1} , foi observada uma melhor modulação da agregação ($\leq 0,4$ mm), com tamanhos mais homogêneos na condição de rotação acima do critério N_{s1} (100 rpm).

Usando o tanque agitado, a pesar que vários trabalhos realizados tanto em escala laboratorial como piloto, têm apresentados resultados promissores, com fatores de expansão maiores que 20 e densidades celulares relevantes, a

problemática relacionada à formação de tamanhos grandes e heterogêneos de agregados ainda é mencionada, principalmente no processo de recuperação final (JOSSEN et al., 2016, 2018; SCHIRMAIER et al., 2014). Apesar disso, são poucos os estudos que acompanham e quantificam seu incremento durante o cultivo, dentre estes, encontra-se o estudo de Jossen e colaboradores (2016), com o cultivo de CEMs-AT usando o critério N_{s1u} (49 rpm) e N_{s1} (63 rpm), atingindo densidades entre $2,5$ e $12,5 \times 10^5$ células/mL, representando FE de 117 e 97, e tamanhos de agregados máximos de $0,580 \pm 0,07$ mm e $0,47 \pm 0,03$ mm, respectivamente. Surpreendentemente, esses pesquisadores não observaram diferenças significativas em relação ao tamanho dos agregados com velocidades de agitação maiores (120 rpm), contrário à densidade celular que foi significativamente menor nessa condição (JOSSEN et al., 2016). Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, para cultivos realizados a velocidades de agitação menores, iguais e acima do critério N_{s1} , foram apresentadas as frequências de agregados com tamanhos entre 0,1 e 1 mm, uma faixa bastante ampla considerando a problemática de recuperação celular em agregados com tamanhos maiores de 0,4 mm. Destes resultados ficou evidente o atraso da formação de agregados com tamanhos maiores a 1 mm e a queda na densidade celular, nas condições de agitação duas vezes maiores ao critério N_{s1} . Em condições de agitação, usando o N_{s1} e uma velocidade levemente acima do N_{s1} , não foram evidenciadas diferenças significativas no crescimento e após sete dias uma queda na frequência de agregados com tamanhos entre 0,1 e 1 mm foi observada, acompanhada por um incremento maior de 60 % da atividade da enzima LDH (JOSSEN et al., 2018). Usando frasco *Spinner* a 30 rpm, Goh e colaboradores (2013) cultivaram CEMs derivadas de tecidos fetais, encontrando concentrações máximas de $3,8 \times 10^5$ células/mL, equivalente a um FE de 7,6, e um tamanho de agregado máximo médio de $0,576 \pm 0,133$ mm (GOH et al., 2013). Usando ferramentas computacionais, Berry e colaboradores tem mostrado que baixas velocidades de agitação, com o intuito de diminuir o estresse gerado pelo movimento do fluido, podem ser contraproducentes, gerando, além de insuficiente mistura, maior exposição a altos níveis de estresse encontrados em regiões com altas tensões de cisalhamento, como as próximas ao

impelidor (BERRY et al., 2016). Esses estudos evidenciam as claras dificuldades encontradas no tanque agitado para o controlar adequadamente a agregação, sem o comprometimento do crescimento e das características funcionais das células aderentes.

Por outro lado, a pesar que alguns estudos têm proposto estratégias para facilitar o processo de recuperação de microcarregadores não porosos, através da agitação no frasco *Spinner* de 5 vezes o N_{s1} (NIENOW et al., 2014; SANTOS et al., 2011; TOZETTI et al., 2017), com tempos de exposição de 7 minutos, nossos resultados têm mostrado que a qualidade das células em termos do potencial de diferenciação pode ser comprometida, devido ao estresse gerado pelas condições hidrodinâmicas no frasco *Spinner* em altas velocidades de agitação no processo de recuperação, já que isto não foi observado no processo de recuperação usando o BEVT a 90 rpm. Embora o uso de microcarregadores porosos implique um maior desafio, devido à necessidade de evitar tamanhos de agregados que limitem a difusão de nutrientes as células encontradas dentro dos poros (SIMARIA et al., 2014; YUAN et al., 2014), as vantagens que eles proporcionam através da proteção oferecida as células da hidrodinâmica do fluido e por disponibilizar maior área para crescimento celular, (entre 11000 e 15000, contra 360 a 5,500 cm²/g dos microcarregadores não porosos), impactam em grande proporção a análise de custos do processo de obtenção de células funcionais como produto (SIMARIA et al., 2014), sendo necessário um adequado controle dos tamanhos durante o cultivo para evitar a formação de grandes agregados e, portanto, longos períodos de exposição à enzima dissociativa, que também são conhecido por afetar a qualidades das células (BROWN et al., 2007).

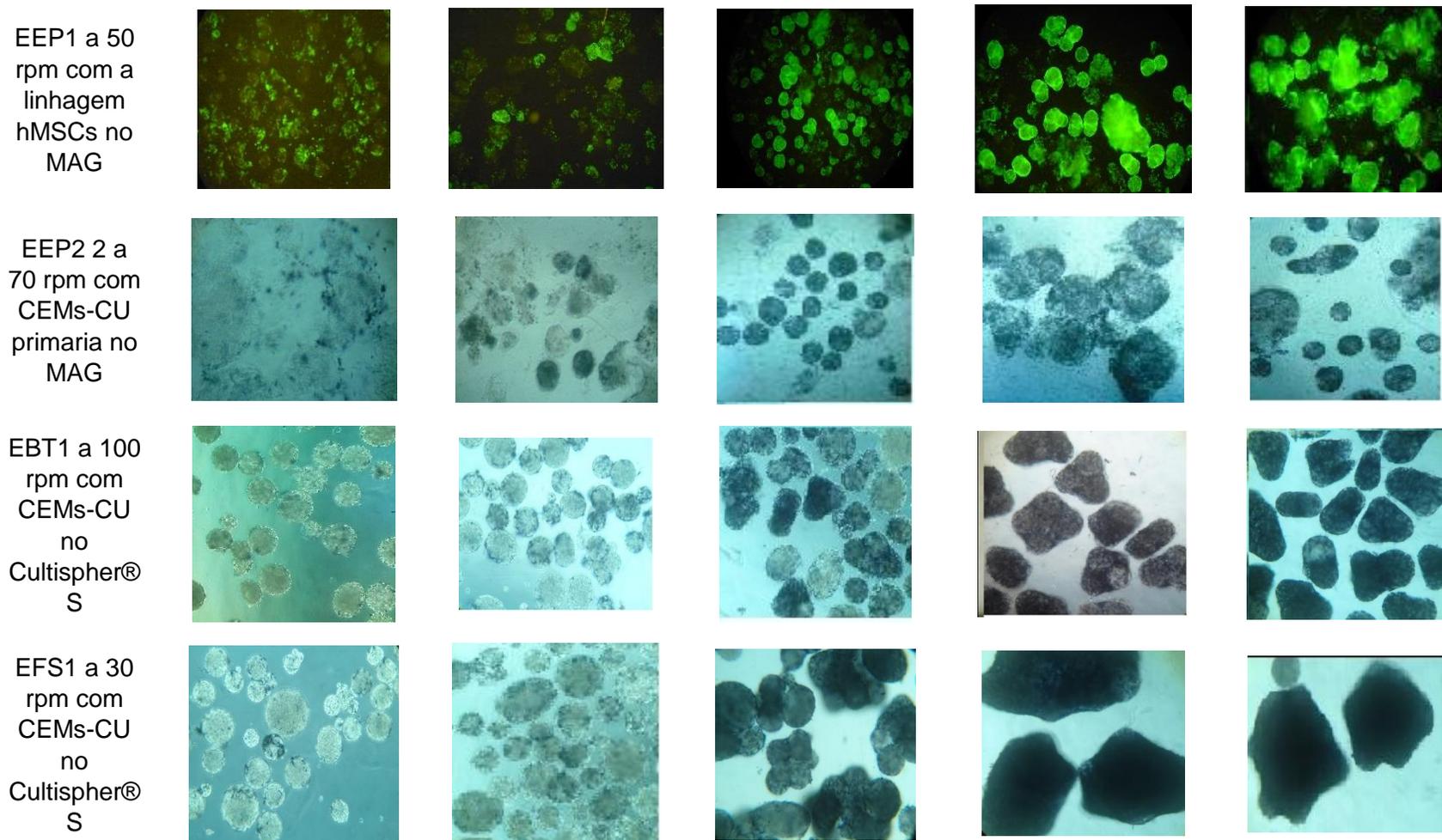
Todos os resultados de condições hidrodinâmicas, crescimento e seguimento fotográfico da formação de agregados durante os cultivos realizados no BEVT e no frasco *Spinner* são apresentados na Tabela 23 e na Figura 63.

Tabela 23. Resumo das condições utilizadas e dos resultados obtidos nos experimentos de cultivo de CEMs no BEVT1, BEVT2 e no frasco *Spinner*.

| Experimento. | BR | Célula | rpm | Conc. de MC (g/L) | Relação Cel/MC | MC | FE | CEMs max. (Células) | μ_{max} (h ⁻¹) | TMA (μ m) | $Y_{lac/glc}$ | k_{La} (h ⁻¹) | τ (N/m ²) | θ_m (s) | VOL. (mL) |
|--------------|----|--------------------|---------|-------------------|----------------|---------------|------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------|---------------|-----------------------------|----------------------------|----------------|-----------|
| EEP1 | T1 | Linhagem hMSC-TERT | 50 | 3 | 50 | MAG | 7,35 | $5,51 \times 10^7$ | 0,010 | 929,47±425,09 | 1,26 | 0,90±0,002 | 0,010 | 53±1,63 | 60 |
| EEP2 | T1 | CEMs-CU | 70 | 3 | 50 | | 7,02 | $4,21 \times 10^7$ | 0,0176 | 490,63±172,80 | 1,28 | 0,92±0,002 | 0,015 | 27±3,40 | |
| EBT1 | T2 | CEMs-CU | 100 | 1 | 30 | Cultispher® S | 10.05±0,46 | $1,75 \pm 0,59 \times 10^7$ | 0,020±0,002 | 360±10,55 | 2,01±0,01 | 1,00±0,30 | 0,024 | 13,6±1,92 | 100 |
| EFS1 | S | | 30 | 1 | 30 | | 9.09±5.01 | $1,68 \pm 0,53 \times 10^7$ | 0,012±0,001 | 750±315,53 | 1,73±0,14 | ND | 0,2 | 14±3,21 | |
| | S | | 30 | 3 | 10 | | 14,8 | $1,58 \times 10^7$ | 0,012 | 366±257 | 1,89 | ND | | | |
| EBT2 | T2 | | 90 | 3 | 10 | | 17,3 | $3,04 \pm 2,37 \times 10^7$ | 0,014±0,005 | 399±109 | 1,8±0,44 | 0,94±0,04 | 0,021 | 14,1 | |
| EFS2 | | | CEMs-TA | 90 | 3 | | 10 | 13,93 | $1,49 \pm 0,54 \times 10^7$ | 0,0125±0,001 | 292 | | | | |

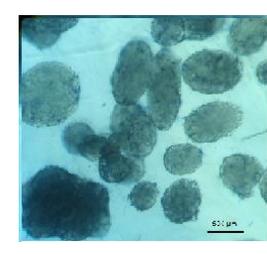
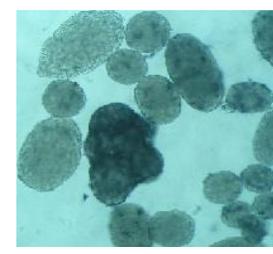
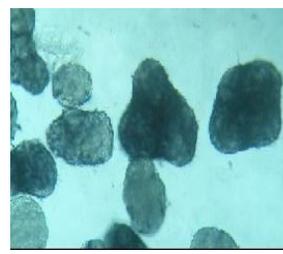
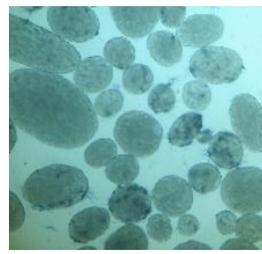
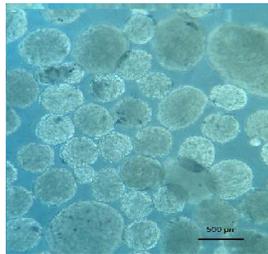
BR=Biorreator; T1-2= BEVT1-2, S=frasco *Spinner*. MC= microcarregador. FE= Fator de expansão. TMA= Tamanho máximo de agregados. ND=Não determinado.

Figura 63. Imagens do cultivo no BEVT1 e BEVT2 das CEMs aderidas aos microcarregadores nos experimentos de cultivo. EP1 às 8 h, 48 h, 120 h, 168 h, 216 h, EP 2 às 8 h, 48 h, 120 h, 168 h, 192-240 h, PC1 e PC2 (BEVT1,2) às 8 h, 48 h, 120 h, 168 h, 216-264 h e PC2 (*Spinner*) 24, 244, 312, 360, 384 e 406 h.

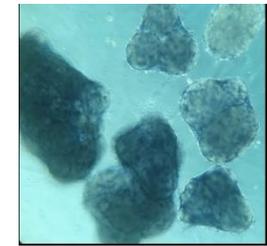
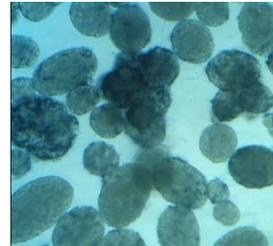
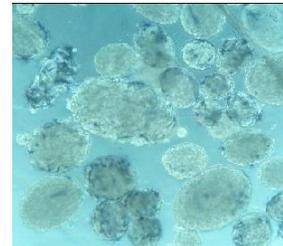
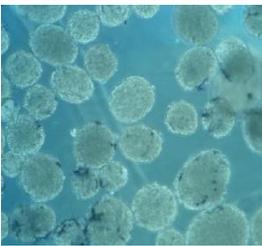


Continuação Figura 63.

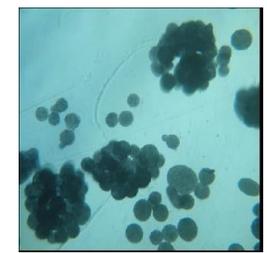
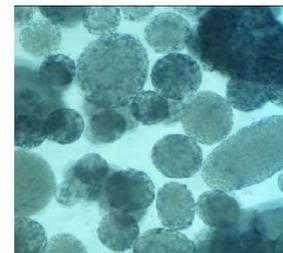
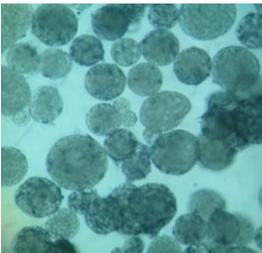
EBT2 a 90
rpm com
CEMs-CU
no
Cultispher®
S



EBT2 a 90
rpm com
CEMs-TA
no
Cultispher®
S



EFS2 a 30
rpm com
CEMs-CU
no
Cultispher®
S



Desta forma, para os experimentos realizados no BEVT2 utilizando o critério N_{s1} , deve ser considerado um incremento na velocidade de rotação após as 96 h, como verificado através dos resultados de frequência de agregados das fotografias obtidas por MEV, que permitam manter uma distribuição de tamanhos de agregados homogênea e menor a 0,3 mm, que facilitem o processo de recuperação celular posterior. Neste sentido, o trabalho de Lawson e colaboradores é um dos poucos trabalhos que mostram a necessidade de utilizar condições levemente acima do N_{s1} , e incrementos graduais na velocidade de agitação durante o cultivo (LAWSON et al., 2017).

Usando uma condição acima do N_{s1} (100 rpm), nossos resultados de cultivos no BEVT2, foram satisfatórios para a concentração de microcarregadores e de células inoculadas, conseguindo uma adequada modulação da agregação, obtendo-se tamanhos homogêneos de $0,360 \pm 0,055$ mm, e um alto de crescimento celular, atingindo densidades de $1,75 \times 10^5$ células/mL, representado um FE de $10 \pm 0,46$. Nesses experimentos o controle no tamanho dos agregados, pode estar relacionado com as características hidrodinâmicas obtidas através da formação de vórtices em regime turbulento, que possibilitaram possivelmente uma grau de classificação das partículas, como apresentado por Ohmura e colaboradores (2005), facilitando o controle indireto dessa variável. Outra possível hipótese, está relacionada com o tamanho dos turbilhões de Kolmogorov, como foi apresentado na Figura 23B, que para essa condição de agitação (100 rpm) é de 106 μm . Desta forma, considerando que o diâmetro médio dos agregados está na ordem de 300 μm e que o tamanho dos turbilhões deveria ser ≥ 200 μm , para garantir que estes não danifiquem as células aderidas na superfície, pode ser que esses turbilhões estejam contribuindo na modulação do tamanho dos agregados, sem afetar as células crescendo na superfície destes, como apresentado pela estabilidade da atividade do LDH. Desta forma, nesta condição de velocidade de rotação, 30 rpm maior que o critério N_{s1} , a taxa de desagregação aumentada ocorre finalmente pela hidrodinâmica em regime turbulento, devido ao fato da agregação ser um fenômeno reversível de acordo com $d_{\text{max}} = C \cdot \varepsilon^{-n}$, onde d_{max} é o tamanho máximo do agregado, ε é a energia dissipada e C e n são constantes, indicando que o tamanho limite dos

agregados de microcarregadores (d_{max}) pode diminuir com o aumento da taxa de cisalhamento em um sistema agitado em regime turbulento (ELIMELECH et al. 1994).

Em termos do rendimento específico de produção de lactato por unidade de glicose, $Y_{Lac/Gli}$, os experimentos realizados no BEVT1 e BEVT2 mostraram um metabolismo energético eficiente (Tabela 23), sendo possível obter em todos os casos valores menores ou iguais ao máximo teórico ($2,0 \text{ mol}_{lac}/\text{mol}_{gli}$), exceto nos cultivos realizados com CEMs-AT, no qual o $Y_{Lac/Gli}$ foi de 3. Valores altos no $Y_{Lac/Gli}$ para CEMs-AT, foram também observado por Jossen e colaboradores, embora em condições de agitação usando o critério de N_{s1u} (JOSSEN et al., 2018). Adicionalmente, as análises das concentrações de lactato e amônia em todos os experimentos, não atingiram concentrações inibitórias para o crescimento, de 35,4 e 2,4 mM, respectivamente (SCHOP, 2010).

Em relação ao potencial de diferenciação nas três linhagens: adipogênica, condrogênica e osteogênica, foi evidenciado que nos cultivos EBT1 a diferenciação adipogênica foi comprometida tanto no BEVT como no *Spinner*, descartando a relação destes resultados com as condições de agitação usadas nos dois casos. Isto pode ter ocorrido possivelmente, devido ao estresse hidrodinâmico gerado no processo de recuperação celular realizado no frasco *Spinner*, utilizando uma condição de agitação de 4 vezes o N_{s1} , embora menor ao recomendado (5 vezes N_{s1}) por vários pesquisadores para o processo de recuperação, pode ter sido a causa da perda do potencial. A perda do potencial de diferenciação é conhecido como um dos efeitos não letais associados aos processos de mecanotransdução como resposta ao estresse hidrodinâmico causado pelas condições de agitação (LIOVIC et al., 2014). Devido a isso, nos experimentos EBT2 a recuperação foi realizada no BEVT usando a mesma velocidade de cultivo, no critério N_{s1} , sem evidenciar diminuição no potencial de diferenciação multilinhagem.

Por outra parte, não foi observada diminuição dos marcadores de superfície, após o processo de recuperação celular, principalmente do CD105 afetado normalmente em sistemas de cultivo dinâmico com microcarregadores (MIZUKAMI et al., 2016). Vale ressaltar que em alguns experimentos a expressão de

marcadores das células recuperadas, foi maior que o controle devido a que essas células foram tratadas diretamente após o descongelamento, sem passar pela adesão em frasco T em 2D, destacando-se a importância do crescimento em 3D favorecida com o uso de biorreatores na manutenção das características importantes das CEMs.

Em relação às tensões de cisalhamento médias encontradas no BEVT, foram menores que as obtidas para o *Spinner*, destacando dois aspectos relevantes no processo de expansão de CEMs. O primeiro está relacionado com a obtenção de agregados com tamanhos homogêneos e baixos como observado com o cultivo EBT1 (realizado a 100 rpm), e o segundo, mostrando a melhora do rendimento do processo de recuperação celular, como evidenciado nos experimentos EBT2, apresentando uma porcentagem de recuperação eficiente sem o comprometimento das qualidades próprias das CEMs.

Entre outros parâmetros avaliados está o k_La obtido para o BEVT1 e BEVT 2, considerados suficientes para garantir uma taxa de consumo de oxigênio de $1,05 \times 10^{-13}$ mmol-célula \cdot h $^{-1}$, típica das CEMs de medula óssea (PATTAPPA et al., 2011). Desta forma, o BEVT pode também ser usado para cultivo de outros tipos de células animais por permitir aeração sem formação de bolhas através da membrana que envolve o cilindro interno.

6. CONCLUSÕES

Na exploração de novas alternativas de biorreatores para cultivo de células aderentes, como no caso do BEVT, foi essencial a avaliação das características hidrodinâmicas de diferentes geometrias do impelidor, podendo assim contribuir e melhorar a performance do biorreator, com a finalidade de encontrar as condições que atendam melhor os requerimentos específicos apresentados no cultivo de CEMs humanas para fins terapêuticos. Neste sentido, nossos resultados mostraram que o BEVT com cilindro interno deformado, operando no regime FWV e turbulento, foi mais eficiente em termos de mistura e suspensão de partículas, com menores requerimentos de potência que os encontrados quando um cilindro interno redondo foi usado. Adicionalmente, foram obtidas baixas tensões de cisalhamento médias, menores que 1 N/m, comparadas com o frasco *Spinner*, e uma adequada transferência de oxigênio, suficientes para garantir a taxa de consumo de oxigênio típica das CEMs humanas.

Os resultados também revelaram que a hidrodinâmica com formação de vórtices no regime turbulento, permitiu modular a agregação, obtendo além disso tamanhos homogêneos formados durante o cultivo de CEMs. Isto não tinha sido observado em outros estudos utilizando outros tipos de biorreatores para cultivo de CEMs humanas. Foi também possível neste trabalho a obtenção de densidades celulares ($1,8 \times 10^5$ células/mL) e fatores de expansão (10 vezes) comparáveis e até maiores com os apresentados na literatura para biorreatores em escala laboratorial.

Com relação à funcionalidade das CEMs, as análises mostraram alta viabilidade e preservação das características imunofenotípicas consideradas importantes nas aplicações terapêuticas. Embora a diferenciação celular tenha apresentado baixa expressão adipogênica nos experimentos realizados a 100 rpm, as causas não parecem estar relacionadas com a hidrodinâmica apresentada nessas condições de rotação, indicando que mais estudos precisam ser realizados para verificar isto.

Dessa forma, esses resultados representam um passo importante no desenvolvimento de uma parte fundamental do bioprocessamento de produção de CEMs

para fins terapêuticos, posicionando o BEVT como uma alternativa de biorreator escalável bastante promissora para atingir este fim.

Nos próximos estudos, será necessária a contribuição de análises computacionais que permitam ter uma aproximação da distribuição dos microcarregadores no volume do BEVT com o cilindro interno deformado, além da obtenção de dados pontuais de tensões de cisalhamento. Nos cultivos de CEMs, será de grande interesse o acompanhamento dos cultivos com aumentos progressivos das velocidades de rotação, para evitar a formação de grandes agregados. Adicionalmente, análise do secretoma das CEMs também será de grande interesse devido aos recentes descobrimentos das CEMs como biofábrica na produção de fatores tróficos com potencial terapêutico, contribuindo também neste campo de conhecimento.

7. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B. M. et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 326, n. 3, p. 527–538, 2005.

ABECASIS, B. et al. Expansion of 3D human induced pluripotent stem cell aggregates in bioreactors: Bioprocess intensification and scaling-up approaches. *Journal of Biotechnology*, v. 246, p. 81–93, 2017.

ANDRADE-ZALDÍVAR, H.; SANTOS, L.; DE LEÓN RODRÍGUEZ, A. Expansion of human hematopoietic stem cells for transplantation: Trends and perspectives. *Cytotechnology*, v. 56, n. 3, p. 151–160, 2008.

ARMENANTE, P. M.; NAGAMINE, E. U.; SUSANTO, J. Determination of correlations to predict the minimum agitation speed for complete solid suspension in agitated vessels. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 76, n. 3, p. 413–419, 1998.

ASCANIO, G. Mixing time in stirred vessels: A review of experimental techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 23, n. 7, p. 1065–1076, 2015.

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.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 8, n. 3, p. 301–16, 2004.

BARRETT, T. A et al. Microwell engineering characterization for mammalian cell culture process development. *Biotechnology and bioengineering*, v. 105, n. 2, p. 260–75, 2010.

BERRY, J. D. et al. Characterisation of stresses on microcarriers in a stirred bioreactor. *Applied Mathematical Modelling*, v. 40, n. 15–16, p. 6787–6804, 2016.

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

BRUCATO, A. et al. Particle suspension in top-covered unbaffled tanks. *Chemical Engineering Science*, v. 65, n. 10, p. 3001–3008, 2010.

BULGHER, D. et al. NASA's Bioreactor: Growing Cells in a Microgravity Environment. National Aeronautics and Space Administration: Educational Brief, p. 1–18, 2002.

CABARET, F. et al. Mixing Time Analysis Using Colorimetric Methods and Image Processing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 46, n. 14, p. 5032–5042, 2007.

CAMPERO, R. J.; VIGIL, R. D. Axial dispersion during low Reynolds number Taylor-Couette flow: intra-vortex mixing effects. *Chemical Engineering Science*, v. 52, n. 19, p. 3303–3310, 1997.

CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *Journal of cellular physiology*, v. 213, p. 341–347, 2007.

CARUSO, R. et al. Growth and Functional Harvesting of Human Mesenchymal Stromal Cells Cultured on a Microcarrier-Based System. *Biotechnology progress*, v. 30, n. 4, p. 889–895, 2014.

CERRI, M. O. Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes. São Carlos, sp, [Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos], 2009.

CHALMERS, J. J. Mixing, aeration and cell damage, 30+ years later: What we learned, how it affected the cell culture industry and what we would like to know more about. *Current Opinion in Chemical Engineering*, v. 10, p. 94–102, 2015.

CHEN, A. K.-L.; REUVENY, S.; OH, S. K. W. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 7, p. 1032–1046, 2013.

CHEN, Y.-S. Mesenchymal Stem Cell: Considerations for Manufacturing and Clinical Trials on Cell Therapy Product. *International Journal of Stem cell Research & Therapy*, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2016.

CHEN, Y.-S. et al. Mesenchymal Stem Cell: Considerations for Manufacturing and Clinical Trials on Cell Therapy Product. *International Journal of Stem cell Research & Therapy*, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2016.

CHERRY, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, v. 32, n. 8, p. 1001–14, 1988.

COLLIGNON, M. L. et al. Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 108, p. 30–43, 2016.

CROUGHAN, M. S. et al. Novel Single-Use Bioreactors for Scale-Up of Anchorage-Dependent Cell Manufacturing for Cell Therapies. In: *Stem Cell Manufacturing*. Elsevier, 2016. p. 105–139.

CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J.-F.; WANG, D. I. C. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. 1987. *Biotechnology and bioengineering*, v. 95, n. 2, p. 295–305, 2006.

CUENCA, J. et al. The Reparative Abilities of Menstrual Stem Cells Modulate the Wound Matrix Signals and Improve Cutaneous Regeneration. *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. MAY, p. 1–19, 2018.

CURRAN, S. J.; BLACK, R. A. Oxygen transport and cell viability in an annular flow bioreactor: comparison of laminar Couette and Taylor-vortex flow regimes. *Biotechnology and bioengineering*, v. 89, n. 7, p. 766–74, 2005a.

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.

CURRAN, S. J.; BLACK, R. A. Taylor-Vortex Bioreactors for Enhanced Mass Transport. In: CHAUDHURI, J.; AL-RUBEAI, M. (Eds.). *Bioreactors for Tissue Engineering*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005b. p. 47–85.

DARIOLLI, R. et al. Porcine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Retain Their Proliferative Characteristics, Senescence, Karyotype and Plasticity after Long-Term Cryopreservation. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 2013.

DE LA PORTILLA, F. et al. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: Results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 28, n. 3, p. 313–323, 2013.

DECARLI, M. C. et al. DROSOPHILA S2 cell culture in a WAVE Bioreactor: potential for

scaling up the production of the recombinant rabies virus glycoprotein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 11, p. 4773–4783, 2018.

DELAFOSSÉ, A. et al. Solid-liquid suspension of microcarriers in stirred tank bioreactor – Experimental and numerical analysis. *Chemical Engineering Science*, v. 180, p. 52–63, 2018.

DESMET, G.; VERELST, H.; BARON, G. V. Local and Global Dispersion Effect in Couette-Taylor Flow. I. Description and Modeling of the Dispersion Effects. *Chemical Engineering Science*, v. 51, n. 8, p. 1287–1298, 1996.

DISTELHOFF, M. F. W.; MARQUIS, A. J. Scalar mixing measurements in a continuously operated stirred tank. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 79, n. 2, p. 187–202, 2001.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DUFFY, C. R. E. et al. Long term mesenchymal stem cell culture on a defined synthetic substrate with enzyme free passaging. *Biomaterials*, v. 35, n. 23, p. 5998–6005, 2014.

DUNLOP, E. H.; NAMDEV, P. K. EFFECT OF FLUID SHEAR FORCES ON PLANT CELL SUSPENSIONS. *Chemical Engineering Science*, v. 49, n. 14, p. 2263–2276, 1994.

EIBES, G. et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of biotechnology*, v. 146, n. 4, p. 194–7, 2010.

ENGLISH, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. n. October 2012, p. 19–26, 2013.

FERRARI, C. et al. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. *Biotechnology progress*, p. 1–8, 2012.

FRANCIS, K. M.; CONNOR, K. I. M. C. O.; SPAULDING, G. F. CULTIVATION OF FALL ARMYWORM OVARY CELLS IN SIMULATED MICROGRAVITY. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, n. May, p. 332–336, 1997.

FRASER, J. K. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.

Trends in Biotechnology, v. 24, n. 4, p. 150–154, 2006.

GARCIA-BRIONES, M. A.; CHALMERS, J. J. Flow parameters associated with hydrodynamic cell injury. *Biotechnology and bioengineering*, v. 44, n. 9, p. 1089–98, 1994.

GIL L. V. G. Avaliação da expansão de células estromais mesenquimais em Biorreator de Escoamento em Vórtices de Taylor (BEVT). 2015. 153 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

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

GODARA, P.; MCFARLAND, C. D.; NORDON, R. E. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, p. 408–420, 2008.

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

GOERGEN, J. L.; MARC, A; ENGASSER, J. M. Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnology*, v. 11, n. 3, p. 189–95, 1993.

GOH, T. K.-P. et al. Microcarrier Culture for Efficient Expansion and Osteogenic Differentiation of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells. *BioResearch Open Access*, v. 2, n. 2, p. 84–97, 2013.

GREGORIADES, N. et al. Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow. *Biotechnology and bioengineering*, v. 69, n. 2, p. 171–82, 2000.

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.

HEATHMAN, T. R. et al. The translation of cell-based therapies: Clinical landscape and manufacturing challenges. *Regenerative Medicine*, v. 10, n. 1, p. 49–64, 2015.

HEWITT, C. J. et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers.

Biotechnology Letters, v. 33, n. 11, p. 2325–2335, 2011.

IBRAHIM, S.; NIENOW, A. W. Suspension of Microcarriers for Cell Culture. Chemical Engineering Research and Design, n. September, p. 1082–1088, 2004.

ILANCHERAN, S.; MOODLEY, Y.; MANUELPILLAI, U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? Placenta, v. 30, n. 1, p. 2–10, 2009.

ISMADI, M.-Z.; HOURIGAN, K.; FOURAS, A. Experimental Characterisation of Fluid Mechanics in a Spinner Flask Bioreactor. Processes, v. 2, n. 4, p. 753–772, 2014.

JAFARI, R.; CHAOUKI, J.; TANGUY, P. A. A comprehensive review of just suspended speed in liquid-solid and gas-liquid-solid stirred tank reactors. International Journal of Chemical Reactor Engineering, v. 10, n. 1, 2012.

JAFARI, R.; TANGUY, P. A.; CHAOUKI, J. Characterization of Minimum Impeller Speed for Suspension of Solids in Liquid at High Solid Concentration, Using Gamma-Ray Densitometry. International Journal of Chemical Engineering, v. 2012, p. 1–15, 2012.

JANES, D. A.; THOMAS, N. H.; CALOW, J. A. Demonstration of a Bubble-Free Annular-Vortex Membrane Bioreactor for Batch Culture of Red Beet Cells. Biotechnology Techniques, v. 1, n. 4, p. 257–262, 1987.

JAZEDJE, T. et al. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. Journal of translational medicine, v. 7, p. 46, 2009.

JOSSEN, V. et al. Theoretical and Practical Issues That Are Relevant When Scaling Up hMSC Microcarrier Production Processes. Stem Cells International, v. 2016, p. 1–15, 2016.

JOSSEN, V. et al. Growth Behavior of Human Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells at Small Scale: Numerical and Experimental Investigations. Bioengineering, v. 5, n. 4, p. 106, 2018.

JUNG, S. et al. Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. Biotechnology and applied biochemistry, v. 59, n. 2, p. 106–20, 2012.

KAISER, S. C. et al. CFD for Characterizing Standard and Single-use Stirred Cell Culture Bioreactors. In: Computational Fluid Dynamics Technologies and Applications. InTech, 2011. p. 97–122.

KAISER, S. C. et al. Fluid flow and cell proliferation of mesenchymal adipose-derived stem cells in small-scale, stirred, single-use bioreactors. *Chemie-Ingenieur-Technik*, v. 85, n. 1–2, p. 95–102, 2013.

KANG, H.-W. et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 3, p. 312–319, 2016.

KATAOKA, K. et al. Ideal Plug-Flow Properties of Taylor Vortex Flow. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 8, n. 6, p. 472–476, 1975.

KERN, S. et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, v. 24, n. 5, p. 1294–1301, 2009.

KINNEY, M. A.; SARGENT, C. Y.; MCDEVITT, T. C. The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, v. 17, n. 4, p. 249–62, 2011.

KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS, E. T. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnology and bioengineering*, v. 36, p. 980–87–9, 1990.

LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. *Blood Reviews*, v. 19, n. 1, p. 29–38, 2005.

LAMBERTO, D. J. et al. Using time-dependent RPM to enhance mixing in stirred vessels. *Chemical Engineering Science*, v. 51, n. 5, p. 733–741, 1996.

LARONDA, M. et al. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nature Communications*, v. 8, n. May, p. 1–10, 2017.

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, 2017.

LEGRANDT, J.; COEURET, F. CIRCUMFERENTIAL PHASE MIXING IN ONE-PHASE VORTEX FLOWS TWO-. *Chemical Engineering Science*, v. 41, p. 47–53, 1986.

LIOVIC, P. et al. FLUID FLOW AND STRESSES ON MICROCARRIERS IN SPINNER FLASK BIOREACTORS. n. December, p. 1–6, 2012.

LIOVIC, P. et al. Computations of Flow Environments in Medium-Scale Stirred-Tank Bioreactors for Stem Cell Expansion. p. 1-7, 2014.

LIU, N. et al. Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing. *Engineering in Life Sciences*, v. 14, n. 1, p. 4–15, 2014.

LIU, T. et al. Analysis on forces and movement of cultivated particles in a rotating wall vessel bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 18, n. 2, p. 97–104, 2004.

LONG, Q. et al. The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development. *Journal of biotechnology*, v. 192 Pt B, p. 323–38, 2014.

MA, T.; TSAI, A.-C.; LIU, Y. Biomanufacturing of human mesenchymal stem cells in cell therapy: Influence of microenvironment on scalable expansion in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 108, p. 44–50, 2016.

MAGELLI, F. et al. Mixing time in high aspect ratio vessels stirred with multiple impellers. *Chemical Engineering Science*, v. 101, p. 712–720, 2013.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MARTIN, Y.; VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, v. 26, n. 35, p. 7481–503, 2005.

MCLAREN, A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, v. 414, n. November, p. 129–131, 2001.

MILLER, W. M.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, n. 8, p. 947–965, 1988.

MIZUKAMI, A. et al. Efficient Expansion of Mesenchymal Stromal Cells in a Disposable Fixed Bed Culture System. *Biotechnology progress*, v. 29, n. 2, p. 568–572, 2013.

MIZUKAMI, A. et al. Stirred tank bioreactor culture combined with serum-/xenogeneic-free culture medium enables an efficient expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnology Journal*, v. 11, n. 8, p. 1048–1059, 2016.

MIZUKAMI, A. et al. Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion:

Experimental performance and cost of goods analysis. *Biochemical Engineering Journal*, v. 135, p. 36–48, 2018.

MOORE, C. M. *Characterization of a Taylor Couette Vortex Flow Reactor*. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 1994.

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

MOREIRA, J. L. et al. Hydrodynamic effects on BHK cells grown as suspended natural aggregates. *Biotechnology and bioengineering*, v. 46, n. 4, p. 351–60, 1995b.

NEMRI, M. et al. Experimental and numerical investigation on mixing and axial dispersion in Taylor–Couette flow patterns. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 91, n. 12, p. 2346–2354, 2013.

NEMRI, M. et al. Experimental investigation of mixing and axial dispersion in Taylor-Couette flow patterns. *Experiments in Fluids*, v. 55, n. 7, p. 2346–2354, 2014.

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.

NG, Y. C.; BERRY, J. M.; BUTLER, M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotechnology and bioengineering*, v. 50, n. 6, p. 627–35, 1996.

NIENOW, A. W. et al. A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. *Biochemical Engineering Journal*, v. 85, p. 79–88, 2014.

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

NITKIN, C. R.; BONFIELD, T. L. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Therapy for Pediatric Disease: Perspectives on Success and Potential Improvements. *STEM CELLS Translational Medicine*, v. 6, n. 2, p. 539–565, 2017.

O’CONNOR, T. P.; CRYSTAL, R. G. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary

disorders. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 4, p. 261–276, 2006.

OHMURA, N. et al. Effective mass diffusion over cell boundaries in a Taylor-Couette flow system. *Chemical Engineering Science*, v. 52, n. 11, p. 1757–1765, 1997.

OHMURA, N.; SUEMASU, T.; ASAMURA, Y. Particle classification in Taylor vortex flow with an axial flow. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 14, p. 64–71, 2005.

OSMAN, J. J.; BIRCH, J.; VARLEY, J. The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 75, n. 1, p. 63–73, 2001.

OTSUJI, T. G. et al. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Reports*, v. 2, n. 5, p. 734–745, 2014.

PANÉS, J. et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *The Lancet*, v. 388, n. 10051, p. 1281–1290, 2016.

PAPOUTSAKIS, E. T. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends in biotechnology*, v. 9, n. 12, p. 427–37, 1991.

PATTAPPA, G. et al. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *Journal of cellular physiology*, v. 226, n. 10, p. 2562–70, 2011.

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

POTAPOVA, I. A. et al. Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 19, p. 13100–13107, 2008.

QUESNEY, S. et al. Characterization of Vero cell growth and death in bioreactor with serum-containing and serum-free media. *Cytotechnology*, v. 35, n. 2, p. 115–25, 2001.

RACHER, A. J.; LOOBY, D.; GRIFFITHS, J. B. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology*, v. 3, n. 3, p. 301–7, 1990.

RAFIQ, Q. A. et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology Letters*, v. 35, n. 8, p. 1233–1245, 2013.

ROBERTS, E. L. et al. Improved expansion of equine cord blood derived mesenchymal

stromal cells by using microcarriers in stirred suspension bioreactors. *Journal of Biological Engineering*, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2019.

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

RODRIGUEZ, A. M. et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, v. 87, n. 1 SPEC. ISS., p. 125–128, 2005.

ROMANOV, Y. A. et al. Human allogeneic AB0/Rh-identical umbilical cord blood cells in the treatment of juvenile patients with cerebral palsy. *Cytotherapy*, v. 17, n. 7, p. 969–978, 2015.

SÁNCHEZ CERVANTES, M. I. et al. Novel bioreactor design for the culture of suspended mammalian cells. Part I: Mixing characterization. *Chemical Engineering Science*, v. 61, n. 24, p. 8075–8084, 2006.

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

SANTOS, F. DOS et al. Toward a Clinical-Grade Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Human Sources: A Microcarrier-Based Culture System Under Xeno-Free Conditions. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 17, n. 12, p. 1201–1210, 2011.

SART, S. et al. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, v. 20, n. 5, p. 365–80, 2014.

SART, S.; BEJOY, J.; LI, Y. Characterization of 3D pluripotent stem cell aggregates and the impact of their properties on bioprocessing. *Process Biochemistry*, v. 59, p. 276–288, 2017.

SCHIRMAIER, C. et al. Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Engineering in Life Sciences*, v. 14, n. 3, p. 292–303, 2014.

SCHOP, D. et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, v. 4, n. 2, p. 131–40, 2010.

SCHOP, D. Growth and metabolism of mesenchymal stem cells cultivated on microcarriers.

Enschede, The Netherlands: [s.n.].

SCHUSTER, M. D.; MARTENS, T. P.; ITESCU, S. Allogeneic mesenchymal stem cells for cardiac repair. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, v. 16, n. 1, p. 95–101, 2008.

SCIENCES, M. Ex vivo evaluation of a Taylor-Couette flow , immobilized heparinase I device for clinical application. v. 96, n. March, p. 2350–2355, 1999.

SEN, A.; KALLOS, M. S.; BEHIE, L. A. Effects of Hydrodynamics on Cultures of Mammalian Neural Stem Cell Aggregates in Suspension Bioreactors. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, n. 134, p. 103–113, 2001.

SENGUPTA, T. K.; KABIR, M. F.; RAY, A. K. A Taylor Vortex Photocatalytic Reactor for Water Purification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, n. 23, p. 5268–5281, 2001.

SENSEBE, L.; BOURIN, P. Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Purposes. *Transplantation*, v. 87, p. 49–53, 2009.

SERRA, M. et al. Novel Culture Strategy for Human Stem Cell Proliferation and Neuronal Differentiation. *Journal of neuroscience research*, v. 85, n. 11, p. 2352–2359, 2007.

SERRA, M. et al. Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells. *Annals of Anatomy*, v. 191, n. 1, p. 104–115, 2009.

SHEYN, D. et al. The effect of simulated microgravity on human mesenchymal stem cells cultured in an osteogenic differentiation system: a bioinformatics study. *Tissue engineering. Part A*, v. 16, n. 11, p. 3403–12, 2010.

SIMARIA, A. S. et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: Single-use cell expansion technologies. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 111, n. 1, p. 69–83, 2014.

SINGH, H. et al. Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. *Stem cell research*, v. 4, n. 3, p. 165–79, 2010.

SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, v. 30, n. 1–3, p. 149–58, 1999.

SOOS, M.; WU, H.; MORBIDELLI, M. Taylor-Couette unit with a lobed inner cylinder cross section. *AIChE Journal*, v. 53, n. 5, p. 1109–1120, 2007.

SOUSA, M. F. Q. et al. Production of oncolytic adenovirus and human mesenchymal stem cells in a single-use, Vertical-Wheel bioreactor system: Impact of bioreactor design on performance of microcarrier-based cell culture processes. *Biotechnology Progress*, v. 31, n. 6, p. 1600–1612, 2015.

SUAZO, C. A.T; MOREIRA, F. M. A; WODEWOTZKY, T. I. Processo para produção de microcarregador de espuma biocompatível e biodegradável para uso em cultivo in vitro de células animais aderentes, e microcarregador obtido no processo. Titular: Universidade Federal de São Carlos. BR 10 2016 001877-3. Depósito: 28 jan. 2016.

SUAZO, C. A.T; GIORDANO R. C; SANTIAGO P. A. Taylor vortex flow bioreactor for cell culture. Titular: Universidade Federal de São Carlos. US20110117639A1. Depósito: 05 Jun. 2008. Concessão: 19 Maio. 2011.

TAN, R. K.; EBERHARD, W.; BÜCHS, J. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks. *Chemical Engineering Science*, v. 66, n. 3, p. 440–447, 2011.

TANZEGLOCK, T. A Novel Lobed Taylor-Couette Bioreactor for the Cultivation of Shear Sensitive Cells and Tissues. Braunschweig, Alemanha, [Tese de doutoramento, Universidade Técnica Braunschweig], 2008.

THOMSON, J. A. ET. AL. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 1998.

TOZETTI, P. A. et al. Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions. *Biotechnology Progress*, v. 33, n. 5, p. 1358–1367, 2017.

ULBRICH, C. et al. The impact of simulated and real microgravity on bone cells and mesenchymal stem cells. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, v. 35, n. 2, p. 1–18, 2015.

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

VALLEJOS, J. R. et al. Integrating a 250 mL-spinner flask with other stirred bench-scale cell culture devices: A mass transfer perspective. *Biotechnology Progress*, v. 27, n. 3, p. 803–810, 2011.

VENKAT, R. V.; STOCK, L. R.; CHALMERS, J. J. Study of hydrodynamics in microcarrier culture spinner vessels: A particle tracking velocimetry approach. *Biotechnology and bioengineering*, v. 49, n. 4, p. 456–66, 1996.

WANG, D. et al. The bioreactor: a powerful tool for large-scale culture of animal cells. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 6, n. 5, p. 397–403, 2005.

WEBER, C. et al. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *The open biomedical engineering journal*, v. 1, p. 38–46, 2007.

WEGMEYER, H. et al. Mesenchymal Stromal Cell Characteristics Vary Depending on Their Origin. *Stem Cells and Development*, v. 22, n. 19, p. 2606–2618, 2013.

WOLTERBEEK, H.; VAN DER MEER, A. J. G. M. Optimization, Application, and Interpretation of Lactate Dehydrogenase Measurements in Microwell Determination of Cell Number and Toxicity. v. 3, n. 6, p. 675–683, 2005.

WU, J. et al. Oxygen transport and stem cell aggregation in stirred-suspension bioreactor cultures. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, 2014.

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

YAMANAKA, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, v. 1, n. 1, p. 39–49, 7 2007.

YANG, H. S. et al. Suspension culture of mammalian cells using thermosensitive microcarrier that allows cell detachment without proteolytic enzyme treatment. *Cell Transplantation*, v. 19, n. 9, p. 1123–1132, 2010.

YANG, Y.; ROSSI, F. M. V.; PUTNINS, E. E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials*, v. 28, n. 20, p. 3110–20, 2007.

YEOH, S. L.; PAPADAKIS, G.; YIANNESKIS, M. Determination of mixing time and degree of homogeneity in stirred vessels with large eddy simulation. *Chemical Engineering Science*, v. 60, n. 8–9 SPEC. ISS., p. 2293–2302, 2005.

YOSHIDA, M. et al. Movement of Solid Particles on and off Bottom of an Unbaffled Vessel Agitated by Unsteadily Forward-Reverse Rotating Impeller. *Journal of Fluid Science and*

Technology, v. 3, n. 2, p. 282–291, 2008.

YUAN, X. et al. Aggregation of culture expanded human mesenchymal stem cells in microcarrier-based bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 131, p. 39–46, 2018.

YUAN, Y. et al. Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 8, n. 3, p. 210–225, 2014.

ZUK, P. A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

ZUK, P. A. et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, p. 4279–4295, 2002.

ZUR NIEDEN, N. I. et al. Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors. *Journal of biotechnology*, v. 129, n. 3, p. 421–32, 2007.

8. APÊNDICE A-Código usado para a placa Arduino

Código usado nos sensores Tipo K para a quantificação do tempo de mistura θ_m nas duas configurações do BEVT.

```
#include "max6675.h"

int thermoDO = 2;

int thermoCS = 3;

int thermoCLK = 4;

int vccPin = 5;

int gndPin = 6;

int thermoDO_2 = 8;

int thermoCS_2 = 9;

int thermoCLK_2 = 10;

int vccPin_2 = 11;

int gndPin_2 = 12;

MAX6675 thermocouple(thermoCLK, thermoCS, thermoDO);

MAX6675 thermocouple_2(thermoCLK_2, thermoCS_2, thermoDO_2);

double temperaturaMedia = 0.0;

double temperaturaMedia_2 = 0.0;

unsigned long qtdLeituras = 0;

unsigned long millisAnterior = 0;

unsigned long millisInicial = 0;

void setup() {
```

```
Serial.begin(115200);

// use Arduino pins

digitalWrite(vccPin, HIGH);

digitalWrite(gndPin, HIGH);

pinMode(gndPin, OUTPUT); digitalWrite(gndPin, LOW);

pinMode(vccPin, OUTPUT); digitalWrite(vccPin, HIGH);

digitalWrite(vccPin_2, HIGH);

digitalWrite(gndPin_2, HIGH);

pinMode(gndPin_2, OUTPUT); digitalWrite(gndPin_2, LOW);

pinMode(vccPin_2, OUTPUT); digitalWrite(vccPin_2, HIGH);

delay(500);

millisAnterior = (millis() - millisInicial);
}

void loop() {

  Serial.print(String(millis(), DEC));

  Serial.print(char(9));

  Serial.print(thermocouple.readCelsius(), 2);

  Serial.print(char(9));

  Serial.println(thermocouple_2.readCelsius(), 2);

  delay(200); //espera
}

void loop_bk() {

  unsigned long millisAtual = (millis() - millisInicial);

  //Se deu o tempo, tira a média e imprime

  if ( ( millisAtual - millisAnterior ) >= 600 ) {

    temperaturaMedia = temperaturaMedia / qtdLeituras;
```

```
temperaturaMedia_2 = temperaturaMedia_2 / qtdLeituras;

    Serial.print(String(millisAtual, DEC));

Serial.print(char(9));

Serial.print(thermocouple.readCelsius(), 2);

Serial.print(char(9));

Serial.println(thermocouple_2.readCelsius(), 2);

temperaturaMedia = 0;

temperaturaMedia_2 = 0;

qtdLeituras = 0;

millisAnterior = millisAtual;

//Se não deu o tempo, soma mais uma leitura para a média

} else {

    temperaturaMedia = temperaturaMedia + thermocouple.readCelsius();

    temperaturaMedia_2 = temperaturaMedia_2 + thermocouple.readCelsius();

    qtdLeituras++;

}

delay(200); //espera

}
```

9. ANEXO A – Tabelas de resultados

Resultados obtidos do experimento EP1 com hMSCs-TERT a 50 rpm. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalizador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo.

| Tempo (h) | Glicose (mM) | Lactato (mM) | Glutamina (mM) | Arginina (mM) | Amônia (mM) |
|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------|
| 0 | 11,6 | 2,75 | 3,28 | 2,62 | 0,057 |
| 24 A | 9,44 | 4,04 | 2,79 | 1,98 | |
| 24 D | 10,6 | 3,62 | | | |
| 120 A | 7,29 | 6,75 | 2,95 | 1,99 | 0,10 |
| 120 D | 5,34 | 3,14 | | | 0,08 |
| 168 D | 8,98 | 6,20 | | | 0,08 |
| 192 A | 5,84 | 7,71 | | | |
| 192 D | 9,91 | 6,36 | | | |
| 216 | 7,50 | 8,56 | | | 0,12 |

Resultados obtidos do experimento EP2 com CEMs de cordão umbilical a 70 rpm. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalizador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo.

| Tempo (h) | Glicose (mM) | Lactato (mM) | Glutamina (mM) | Arginina (mM) | Amônia (mM) |
|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------|
| 8 | 8,50 | 2,96 | | | |
| 24 D | 9,80 | 3,51 | 2,60 | 2,36 | |
| 76 D | 9,40 | 4,77 | | | |
| 96 D | 9,37 | 5,21 | | | 0,11 |
| 120 D | 9,24 | 5,28 | 1,99 | 2,44 | 0,11 |
| 168 D | 8,56 | 6,25 | | | 0,14 |
| 240 | 5,37 | 10,1 | 2,09 | 2,68 | |

Resultados obtidos do experimento PC1 com CEMs de cordão umbilical a 100 rpm. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo antes das trocas de meio, n=3.

| Tempo (h) | Glicose (mM) | Lactato (mM) | Glutamina (mM) | Arginina (mM) | Amônia (mM) |
|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------|
| 0 | 9,42±0,29 | 1,36±0,20 | 2,19±0,0 | 2,05±0,0 | |
| 8 | 9,32±0,42 | 1,43±0,15 | 2,48±0,36 | 2,74±1,21 | 0,81±0,26 |
| 24 | 8,88±0,43 | 1,85±0,10 | 1,73±0,15 | 1,96±0,24 | 1,06 |
| 48 | 8,845±0,60 | 2,375±0,43 | | | |
| 72 | 9,09±0,36 | 2,65±0,03 | 2,05±0,59 | 4,1±0,34 | 1,11±0,63 |
| 96 | 8,48±0,41 | 3,43±0,19 | 1,68±0,04 | 2,97±0,55 | 1,56±0,41 |
| 96 | 8,695±0,21 | 2,695±0,09 | | | 1,20±0,20 |
| 120 | 7,63±0,15 | 3,47±0,16 | 1,36±0,06 | 2±0,04 | 1,32±0,31 |
| 144 | 7,84±0,20 | 4,58±0,02 | | | |
| 144 | 8,17±0,25 | 3,55±0,78 | | | |
| 168 | 7,77±0,70 | 4,76±0,88 | | | 1,15±0,23 |
| 192 | 7,04±0,19 | 5,405±0,30 | 1,14±0,23 | 2,09±0,04 | 1,80 |

Resultados obtidos do experimento PC1 com CEMs de cordão umbilical a 30 rpm no frasco *Spinner*. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo antes das trocas de meio, n=3.

| Tempo (h) | Glicose (mM) | Lactato (mM) | Glutamina (mM) | Arginina (mM) | Amônia (mM) |
|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------|
| 8 | 8,96±0,13 | 1,24±0,29 | 2,4±0,01 | 2,88±0,09 | |
| 24 | 8,79±0,55 | 1,73±0,06 | | | |
| 48 | 8,52±0,55 | 2,14±0,08 | 2,19±0,01 | 2,73±0,08 | |
| 72 | 8,36±0,49 | 2,74±0,24 | | | |

| | | | | |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 96 | 8,08±0,67 | 3,58±0,56 | 1,89±0,01 | 2,81±0,29 |
| 96 | 9,3±0,26 | 2,51±0,50 | | |
| 120 | 8,43±0,27 | 3,87±0,91 | | |
| 144 | 7,66±0,47 | 5,44±0,21 | 2,28±0,01 | 3,19±0,08 |
| 144 | 8,66±1,38 | 3,88±2,19 | | |
| 192 | 7,03±0,46 | 6,53±1,16 | 2,06±0,05 | 3,06±0,48 |

Resultados obtidos do experimento PC2 com CEMs de cordão umbilical a 30 rpm no frasco *Spinner*. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo.

| Tempo (h) | Glicose (mM) | Lactato (mM) | Glutamina (mM) | Arginina (mM) | Amônia (mM) |
|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------|
| 0 | 9,73 | 1,38 | | | |
| 120 | 8,94 | 2,39 | | | |
| 144A | 8,68 | 2,74 | | | |
| 144D | 9,11 | 2,03 | | | |
| 168 | 8,86 | 2,88 | | | |
| 192 | 8,93 | 3,83 | | | |
| 216A | 8,66 | 4,91 | | | |
| 216D | 9,42 | 3,18 | | | |
| 240 | 8,71 | 4,56 | | | |
| 264 | 7,97 | 5,75 | | | |
| 288A | 7,09 | 6,37 | | | |
| 288D | 8,91 | 3,98 | | | |
| 312 | 7,97 | 5,52 | | | |
| 336 | 7,07 | 5,94 | | | |
| 360A | 6,65 | 6,58 | | | |

360D 7,76 4,68

Resultados obtidos do experimento PC2 com CEMs de cordão umbilical a 90 rpm no frasco *spinner*. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo, n=3.

| Tempo (h) | Glicose (mM) | Lactato (mM) | Glutamina (mM) | Arginina (mM) | Amônia (mM) |
|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------|
| 0 | 9,48±0,28 | 1,37±0,09 | | | |
| 8 | 9,45±0,33 | 1,42±0,20 | 3,65±0,06 | 3±0,0 | |
| 24 | 9,32±0,28 | 1,81±0,21 | | | |
| 48 | 9,23±0,64 | 2,26±0,27 | 3,41±0,10 | 3,12±0,21 | |
| 72 | 8,95±0,36 | 2,78±0,34 | | | |
| 96 | 8,46±0,26 | 3,57±0,43 | | | |
| 96 | 8,94±0,27 | 2,93±0,17 | 2,8±0,11 | 2,9±0,06 | |
| 120 | 8,39±0,27 | 4,18±0,42 | | | |
| 144 | 7,6±0,23 | 5,5±0,60 | 2,61±0,42 | 2,8±0,33 | |
| 168 | 6,75±0,22 | 7,06±0,86 | | | |
| 168 | 7,93±0,63 | 4,35±0,44 | | | |
| 192 | 7,46±0,69 | 6,41±0,85 | 3,22±0,42 | 2,9±0,33 | |
| 216 | 6,62±0,83 | 7,85±1,00 | | | |

Resultados obtidos do experimento PC2 com CEMs de tecido adiposo a 90 rpm no frasco *spinner*. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo, n=3.

| Tempo (h) | Glicose (mM) | Lactato (mM) | Glutamina (mM) | Arginina (mM) | Amônia (mM) |
|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------|
| 0 | 5,18±0,13 | 1,27±0,04 | | | |
| 8 | 4,82±0,35 | 1,35±0,03 | 3,56±0,13 | 0,98±0,016 | |

| | | | | |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 24 | 4,8±0,36 | 1,48±0,09 | | |
| 48 | 4,68±0,35 | 1,65±0,12 | 3,25±0,03 | 0,98±0,02 |
| 72 | 4,65±0,36 | 1,9±0,17 | | |
| 96 | 4,56±0,31 | 2,11±0,24 | | |
| 96 | 4,73±0,28 | 1,96±0,25 | 3,07±0,07 | 1,02±0,06 |
| 144 | 4,6±0,21 | 2,71±0,48 | 3,13±0,0 | 0,92±0,22 |
| 144 | 4,86±0,13 | 2,29±0,31 | | |
| 168 | 4,79±0,06 | 2,6±0,47 | | |
| 192 | 4,44±0,10 | 3,3±0,71 | 2,92±0,22 | 0,73±0,02 |
| 216 | 4,19±0,20 | 3,8±0,86 | | |
| 240 | 3,93±0,26 | 4,3±0,95 | | |
| 264 | 3,87±0,30 | 4,65±0,97 | | |
