BRUNO LABATE VALE DA COSTA

**CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMAIS VISANDO A ALTAS
CONCENTRAÇÕES CELULARES: PROCESSO EM PERFUSÃO E
SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDOS**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

**São Paulo
2013**

BRUNO LABATE VALE DA COSTA

**CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMAIS VISANDO A ALTAS
CONCENTRAÇÕES CELULARES: PROCESSO EM PERFUSÃO E
SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDOS**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

**São Paulo
2013**

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, de maio de 2013.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador _____

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Bruno Labate Vale da

Cultivos de células animais visando a altas concentrações celulares: processo em perfusão e suplementação com amino-ácidos / B.L.V. da Costa. -- versão corr. -- São Paulo, 2013.

117 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Células animais 2. Perfusão 3. Metabolismo celular 4. Bio-processos I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II. t.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Tonso pela amizade, companheirismo, momentos de incentivo, pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, por ter ensinado o que é um mestrado;

À Dr.^a Elisabeth Augusto pelos momentos de valiosas discussões;

Ao Dr. Gustavo Nuñez, pelo apoio e enorme ajuda a todo instante, durante mais da metade desse mestrado;

Aos colaboradores do Laboratório Especial de Pesquisa e Desenvolvimento em Imunológicos Veterinários do Instituto Butantan, em especial ao Dr. Celso Caricati, Jaci Leme e Wagner Chagas. Sem eles não haveria cultivo em perfusão;

Aos pesquisadores e colaboradores do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan pela agradável convivência e, em especial: ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira, Dr. Renato Astray e Dr.^a Soraia Jorge, que mantiveram as portas do LIV sempre abertas; à Daniella Ventini e à Vera Boldorini, por terem sido sempre muitíssimo prestativas;

Aos professores do (hoje) GEnBio: Prof.^a Dr.^a Beatriz Kilikian, Prof. Dr. Andreas Gombert, Prof. Dr. Pedro Pessoa e Prof. Dr. Adriano Azzoni pelos ensinamentos e atenção a qualquer hora;

A todos os alunos que foram ou ainda são do GEnBio e que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, e em especial aos amigos Thiago, Felipe, Paula, Mariana, Bruno, Luís, Janosch, Oscar, Rafael, Wesley, Letícia e Larissa. Obrigado pelas risadas, cervejas, festas, cadeiradas, fotos, infinitos almoços, cafés, viagens e xingamentos gratuitos que demonstram como a convivência com vocês foi agradável;

Aos funcionários da Escola Politécnica Valter, Orlinda, Andrea, Alexandre, Elisete, Graça e Terezinha pelo apoio;

À minha família, sempre interessada e curiosa com o porquê de eu ir aos domingos à noite para a escola;

À Bianca, de quem o apoio e a ajuda foram tão grandes que não sei como agradecer. Mas acima de tudo, obrigado por fazer parte da minha vida;

Aos meus amigos pela paciência nos dias ruins, compreensão quando tive que me ausentar e convivência em todos os outros momentos – Barba, Fábio, Rodrigo, Daniel, Felipe, Thiago, Caê e Vivi;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

“What we anticipate seldom occurs; what we least expected generally happens”.

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Células animais são alvo de pesquisas visando sua utilização como plataforma para a expressão de proteínas recombinantes, desde vacinas veterinárias até fatores de coagulação para hemofílicos. Exemplos incluem células de inseto *Drosophila melanogaster* S2 e células de mamífero BHK-21, que vêm sendo estudadas visando a sua utilização para a produção da glicoproteína do vírus da raiva. Independentemente da estratégia de cultivo utilizada, altas concentrações celulares são em geral associadas a uma maior produção da proteína de interesse. O objetivo deste trabalho foi o de investigar estratégias que possibilitariam o cultivo de células animais em altas concentrações celulares. Células de inseto *Drosophila melanogaster* S2 produtoras da glicoproteína do vírus da raiva foram cultivadas em frascos agitados a 100 rpm e 28 °C, em meio livre de soro SF 900 II suplementado com os aminoácidos asparagina, cisteína, prolina e serina. A adição dos quatro aminoácidos no meio de cultura refletiu em um aumento da concentração celular máxima ($X_{V\text{ MÁX}}$) em 16%. Cisteína, quando adicionada isoladamente no meio de cultura, refletiu em uma velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{MÁX}}$) 56% maior. Nessa condição, o fator de conversão glicose a célula ($Y_{X/\text{GLC}}$) foi 47% maior, indicando um metabolismo de glicose mais eficiente na geração de células. Esses resultados indicam que cisteína é provavelmente substrato limitante do cultivo de células S2AcGPV em meio SF 900 II. Já células de mamífero BHK-21 (C13), adaptadas ao crescimento em suspensão, foram cultivadas em processo de perfusão, processo contínuo em que há retenção celular, o que permite alcançar concentrações celulares mais altas que processos em batelada ou em modo contínuo sem retenção celular. Foi utilizado um biorreator do tipo tanque agitado com 1,5 L de volume de trabalho e *spin-filter* interno, com poro de diâmetro igual a 10 μm , acoplado ao eixo do impelidor. Durante o cultivo, o pH foi controlado em 7,2, a agitação em 80 rpm, a temperatura em 37 °C e o oxigênio dissolvido em 50% da saturação com o ar. A concentração celular máxima alcançou $15,7 \times 10^6$ céls mL^{-1} , muito superior à do cultivo em batelada (aproximadamente 5×10^6 céls mL^{-1}). A viabilidade celular foi superior a 90% durante os 48 dias de cultivo. Na fase batelada

do cultivo em perfusão, as velocidades de consumo de glicose (q_{GLC}) e de glutamina (q_{GLN}) foram 84% e 32% maiores, respectivamente, em relação às velocidades observadas no cultivo em batelada. Analogamente, as velocidades de produção de lactato (q_{LAC}) e de amônio (q_{NH4}) foram 78% e 102% maiores, respectivamente. Ainda, o coeficiente de manutenção celular não foi desprezível, e o consumo de glicose associado à manutenção celular foi de 83%. Esses dados indicam que a presença do *spin-filter* interno pode estar associada a estresse celular. Na perfusão, a concentração celular foi cerca de 3 vezes maior do que no cultivo contínuo sem reciclo de células. Provou-se que é possível cultivar células BHK-21 adaptadas a crescimento em suspensão em altas concentrações celulares em escala laboratorial, utilizando biorreator de bancada e *spin-filter* interno como sistema de retenção celular.

Palavras-chave: Células animais. *Drosophila melanogaster* S2. BHK-21. Perfusão. *Spin-filter*. Metabolismo celular.

ABSTRACT

Animal cells have been under research as a platform for the expression of recombinant proteins, ranging from veterinary vaccines to blood coagulation factors for treating hemophilia. Examples include insect *Drosophila melanogaster* S2 and hamster BHK-21 cells, currently being studied for the production of rabies virus glycoprotein. Regardless of the cultivation strategy, high cell concentrations are usually associated to a higher protein production. Thus, the aim of this research was to investigate animal cell cultivation strategies that would allow higher cell concentrations than those previously reported. Cells of *Drosophila melanogaster* S2 expressing the rabies virus glycoprotein (S2AcGPV) were cultivated in shake flasks at 100 rpm and 28 °C, in SF 900 II serum-free medium supplemented with the following amino acids: asparagine, cysteine, proline, and serine. The addition of the four amino acids to the medium increased the maximum cell concentration (X_{VMAX}) in 16%. When only cysteine was added to the medium, the maximum specific growth rate (μ_{MAX}) was 56% higher. In this condition, the cell yield on glucose ($Y_{X/GLC}$) was 47% higher, indicating a more efficient glucose metabolism. These results show that cysteine is likely a limiting substrate of S2AcGPV cells growing in SF 900 II medium. In turn, baby hamster kidney cells (BHK-21/C13), adapted to growth in suspension culture, were cultivated in perfusion, a continuous process with cell retention that allows higher cell concentration than batch or continuous cultures without cell retention. A stirred tank bioreactor with a working volume of 1.5 L was used, with an internal spin-filter with 10 μm diameter pores attached to the impeller shaft. Temperature was controlled at 37 °C, pH at 7.2, agitation at 80 rpm and dissolved oxygen at 50% of air saturation. The maximum cell concentration reached $15.7 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$, much higher than the cell concentration achieved in a standard batch cultivation ($5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$). Cell viability was above 90% during the 48-day cultivation period. During the batch phase of the perfusion cultivation, specific rates of glucose (q_{GLC}) and glutamine (q_{GLN}) consumption were 84% and 32% higher, respectively, when compared to the batch cultivation. Similarly, the specific rates of lactate (q_{LAC}) and ammonium (q_{NH4}) formation were 78% and 102% higher,

respectively. During perfusion, the cell maintenance coefficient was not negligible and represented 83% of total glucose consumption. These data indicate that the presence of an internal spin-filter may be associated to cell stress. In perfusion, cell concentration was about 3 times higher than that in continuous culture without cell recycle. In conclusion, it was proved that suspension-adapted BHK-21 cells can be cultivated in a laboratory-scale bioreactor with an internal spin-filter, in order to achieve high cell concentrations.

Key words: Animal cells, *Drosophila melanogaster* S2. BHK-21. Perfusion. Spin-filter. Cell metabolism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 A RAIVA E O VÍRUS DA RAIVA	18
3.2 CÉLULAS ANIMAIS	20
3.2.1 Meio de cultura	23
3.2.2 Células de inseto	25
3.2.2.1 A célula S2	27
3.2.2.2 A linhagem de células S2 co-transfectadas para expressão de GPV	29
3.2.3 Células de mamífero	30
3.2.3.1 A célula BHK-21	33
3.3 METABOLISMO DE CÉLULAS ANIMAIS	34
3.3.1 Metabolismo de carboidratos	34
3.3.2 Metabolismo de glutamina	38
3.3.3 Metabolismo de outros aminoácidos	40
3.4 CULTIVO EM BIORREATOR	42
3.4.1 Batelada e batelada alimentada	43
3.4.2 Quimiostato	46
3.4.2.1 Balanço de células para o processo contínuo	49
3.4.3 Perfusão	50
3.4.3.1 Balanço de células para o processo em perfusão	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 CULTURA COM CÉLULAS S2	55
4.1.1 Linhagens celulares e meio de cultura	55
4.1.2 Banco de células e preparo do inóculo	57
4.2 CULTURA COM CÉLULAS BHK	58
4.2.1 Linhagem celular e meio de cultura	58
4.2.2 Banco de células e preparo do inóculo	58

4.3 CULTIVOS EM FRASCO SCHOTT	59
4.3.1 Teste com diferentes concentrações de aminoácidos	59
4.3.2 Teste com diferentes concentrações de Cisteína	60
4.4 CULTIVOS EM BIORREATOR.....	61
4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	64
4.5.1 Concentração e Viabilidade Celular	64
4.5.2 Concentração de Glicose e de Lactato	65
4.5.3 Concentração de Glutamina e de Glutamato	65
4.5.4 Concentração de Amônio.....	66
4.5.5 Concentração de GPV.....	67
4.6 TRATAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	67
4.6.1 Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento	67
4.6.2 Cálculo dos fatores de conversão.....	68
4.6.3 Cálculo das velocidade específicas de consumo de substratos e de produção de metabólitos.....	69
4.6.4 Cálculo do fator de eficiência do sistema de retenção	69
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 ENSAIOS EM BIORREATOR COM CÉLULAS S2	71
5.1.1 Cultivo S2Ac-1	72
5.1.2 Cultivo S2Ac-2	73
5.1.3 Cultivo S2s-3.....	74
5.2 ENSAIOS EM FRASCOS SCHOTT COM CÉLULAS S2	75
5.2.1 Teste com diferentes concentrações de aminoácidos	76
5.2.2 Teste com diferentes concentrações de cisteína.....	81
5.3 ENSAIOS EM BIORREATOR COM CÉLULAS BHK.....	85
5.3.1 Cultivo em batelada BHK-B.....	86
5.3.2 Cultivo em perfusão BHK-P	89
6 CONCLUSÕES.....	99
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	101
REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Células animais vêm sendo utilizadas como sistema de expressão de proteínas heterólogas com aplicação terapêutica. Atualmente, os produtos derivados de células animais representam um mercado de dezenas de bilhões de dólares, e possuem grande impacto na qualidade de vida e na saúde humana e animal.

Na década de 80, células imortalizadas de ovário de *hamster* chinês (CHO) começaram a ser estavelmente transformadas e o ativador plasminogênico tecidual (Activase[®]-tPA), produzido por essas células, foi a primeira proteína recombinante produzida por uma célula animal aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1987. Para a sua produção em larga escala, foram utilizados biorreatores do tipo tanque agitado, uma adaptação da tecnologia existente até então utilizada para o cultivo de micro-organismos.

Desde então, diversos sistemas de expressão foram desenvolvidos utilizando células animais como plataforma, devido principalmente a sua capacidade em realizar modificações pós-tradução complexas necessárias para a perfeita atividade biológica da proteína de interesse. As modificações pós-tradução adequadas viabilizam a utilização de moléculas, com elevado grau de complexidade, para fins terapêuticos em seres humanos.

Neste cenário, células de mamífero têm sido amplamente utilizadas para expressar um grande leque de proteínas como anticorpos, antígenos virais, hormônios e enzimas – o fator de coagulação XIII produzido por células de rim de *hamster* chinês (BHK), cuja demanda anual é de 150 gramas, é provavelmente a maior e mais complexa proteína já produzida em biorreator.

Células de inseto, por sua vez, têm sido cada vez mais utilizadas para o mesmo propósito, visto que atingem elevadas concentrações celulares, geralmente não requerem controle de pH por adição de CO₂ e podem ser cultivadas em temperaturas mais baixas. Células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) e de *Trichoplusia ni* (IBTI-TN-5BI-4 ou HighFive[®]) são utilizadas para a obtenção de proteínas recombinantes principalmente a partir de infecção por baculovírus. Apesar de ser muito eficiente, o sistema célula de inseto-baculovírus é transiente, o que dificulta a

ampliação de escala do processo. A célula de *Drosophila melanogaster* (S2) no entanto, pode expressar proteínas heterólogas sem a necessidade da infecção por vírus, sendo estavelmente transformada por plasmídeos e expressando constitutivamente a proteína recombinante. Clements *et al.* (2010) produziram, em células S2, a subunidade 80E da proteína do envelope do vírus da dengue, atualmente em fase de testes pré-clínicos para a utilização como vacina. A célula S2 transformada pode ainda ser cultivada em suspensão em altas concentrações, possibilitando a utilização de cultivos contínuos.

Nas três décadas que se sucederam após a aprovação pela FDA da primeira proteína recombinante produzida em uma célula animal, avanços relacionados à tecnologia do processo permitiram que a concentração celular de um cultivo em batelada alimentada atingisse de 10 a 15 milhões de células/mL em 21 dias de cultivo, e que processos em perfusão se estendessem por 185 dias de cultivo contínuo e alcançassem 20 milhões de células/mL, em comparação com uma batelada típica com duração de 7 dias e concentração celular máxima entre 1 e 2 milhões de células/mL no final dos anos 80. Às altas concentrações celulares e à maior longevidade dos cultivos, estão associadas elevadas produtividades. O constante desenvolvimento da tecnologia, desde a otimização do meio de cultura e sistemas de transferência de oxigênio mais eficientes até elaborados dispositivos de perfusão e controle do metabolismo celular, vem permitindo cultivos em concentrações celulares cada vez mais altas, processos mais robustos e produtos de melhor qualidade e homogeneidade.

Nos últimos anos, linhagens da célula S2 produtoras da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) vêm sendo estudadas visando a produção de uma vacina. Diversas variáveis relacionadas ao cultivo, tais como formulações de meio de cultura, frequência de agitação, pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido têm sido avaliadas a fim de determinar as melhores condições de cultivo. Estes estudos foram, no entanto, realizados em processo em batelada e batelada alimentada. Vieira (2010) estabeleceu uma metodologia para o cultivo contínuo das células S2, permitindo aprofundar ainda mais os conhecimentos a respeito da fisiologia e dos requerimentos nutricionais por parte das células S2. Neste cenário, o emprego de cultivos em perfusão é uma possibilidade para o aumento da concentração celular.

A produção da GPV não é restrita apenas à célula S2, podendo a proteína ser expressa em outras linhagens de células animais utilizando o *Semliki Forest Virus* (SFV). O sistema SFV vem ganhando interesse ao longo das últimas décadas devido a sua eficiência na expressão de proteínas heterólogas, especialmente proteínas e receptores de membrana, e sua utilização com diferentes linhagens de células de mamífero (BHK, VERO) e humanas (HEK-293, Huh-7) já foi avaliada, com resultados promissores em relação à célula BHK (BENMAAMAR *et al.*, 2009).

O estabelecimento de uma metodologia de cultivo em que altas concentrações celulares sejam alcançadas pode significar um aumento considerável na produção de um produto de interesse, sendo esta a motivação deste trabalho.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo cultivar células animais em altas concentrações celulares a partir de duas abordagens distintas: i) Estabelecer uma metodologia de cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2 e de células de rim de *hamster* neonato BHK em perfusão, utilizando biorreator do tipo tanque agitado e *spin-filter* interno como sistema de retenção celular; ii) Utilizando o meio de cultura SF 900 II, suplementá-lo com os aminoácidos candidatos a nutriente limitante do cultivo de células S2 neste meio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A RAIVA E O VÍRUS DA RAIVA

A raiva ou hidrofobia é uma doença letal que compromete o sistema nervoso central associada à infecção por um vírus da família *Lyssavirus* (Figura 3.1) que é capaz de infectar, entre outras espécies de mamíferos, seres humanos. Em sua estrutura, o vírus possui a glicoproteína G (GPV/PV), capaz de induzir resposta imunogênica através da produção de anticorpos neutralizantes (COX; DIETZSCHOLD; SCHNEIDER, 1977). A glicoproteína G é uma proteína transmembrânica – possui um domínio citoplasmático, um domínio transmembrânico e um ectodomínio na superfície do envelope viral. A estrutura do ectodomínio está organizada na forma de um trímero com 195 kDa e a resposta imunogênica é induzida apenas nessa forma.

Figura 3.1 – O vírus da raiva, medindo 180×75 nm e seu genoma, formado por uma fita única de RNA antissenso de 11.9 kb (WARRELL; WARRELL, 2004).

Anualmente, 55 mil pessoas morrem no mundo por infecção com vírus rábico, que é transmitido, na maioria das vezes, pela mordedura de cães infectados, e cerca

de 10 milhões de pessoas recebem tratamento preventivo, após contato com animais em que há suspeita de contaminação (INSTITUT PASTEUR, 2007). O índice de mortalidade em indivíduos infectados pelo vírus rábico não vacinados é de 100% (WARRELL; WARRELL, 2004).

A primeira vacina com atividade imunogênica contra a raiva foi desenvolvida por Louis Pasteur em 1885, extraído-se tecido medular de um coelho infectado. Porém, a presença de uma proteína associada à mielina presente no cérebro desses animais (fator encefalitogênico) era responsável por causar reações adversas que variavam desde paralisia temporária até danos cerebrais permanentes e óbito. Posteriormente, novos métodos de produção foram desenvolvidos utilizando diferentes substratos, como tecido nervoso de animais adultos e ovos embrionados de patos e galinhas, para a obtenção de massa viral (PÉREZ; PAOLAZZI, 1997).

Uma vacina que ainda hoje é utilizada em alguns países da América Latina e pelo menos um país do continente africano (BRIGGS, 2012) é produzida em tecido nervoso de animais lactentes, pois esse grupo de animais não apresenta o fator encefalitogênico (PÉREZ; PAOLAZZI, 1997). Entretanto, a utilização de animais para a produção de vacinas é questionável do ponto de vista ético.

Por esta razão, o desenvolvimento de novas vacinas eficientes e de baixo custo se faz necessário. Atualmente já se encontram disponíveis vacinas contra a raiva produzidas em culturas de células animais. A vacina Verorab[®] (Sanofi Pasteur, Lyon, França) é produzida através da propagação do vírus da raiva em células derivadas de rim de macaco verde africano (VERO) cultivadas em microcarregadores. O produto é aprovado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) para tratamento profilático pré- e pós-exposição. Durante 20 anos de uso, mais de 40 milhões de doses foram administradas em mais de 100 países (dados do ano de 2007) (TOOVEY, 2007).

A vacina Verorab[®] é reconhecidamente eficiente e os estudos clínicos acerca de sua administração atestam a segurança e eficiência do produto. No entanto, para que seja produzida, é necessária a manipulação do vírus ativo para a infecção das células em cultivo, e posterior inativação dos vírus propagados. Visto que a glicoproteína G do vírus da raiva é suficiente para produzir resposta imunogênica,

uma alternativa promissora pra o desenvolvimento de uma nova classe de vacinas é a clonagem e expressão, em células animais, de genes dessa proteína.

3.2 CÉLULAS ANIMAIS

Cultivos *in vitro* de células animais têm sua origem no final do século XIX, em experimentos que tentavam manter viáveis células isoladas de órgãos de diversos animais. Desde então, a tecnologia do cultivo de células animais evoluiu, permitindo o desenvolvimento de novos processos e a produção de vacinas e de glicoproteínas recombinantes. Atualmente, dentre os mais de 500 biofármacos em fase de testes clínicos, 70% são proteínas glicosiladas (DUROCHER; BUTLER, 2009) e cerca de 250 são produzidos por células animais (RAMÍREZ, 2008), de modo que se torna imperativa a necessidade de sistemas de expressão que produzam com eficiência proteínas glicosiladas de alta qualidade.

Os processos envolvendo células animais são, em geral, mais complexos e mais caros do que aqueles que utilizam micro-organismos como plataforma de expressão (Tabela 3.1). Na comparação com micro-organismos, algumas particularidades de células animais são desvantagens no contexto industrial, a saber: apresentam menores velocidades específicas de crescimento; são mais susceptíveis ao cisalhamento por não possuírem parede celular; têm necessidades nutricionais complexas (geralmente mais de um carboidrato, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e outros suplementos); necessitam de suporte para adesão no caso de linhagens aderentes (AUGUSTO; OLIVEIRA, 2001).

Bactérias, por exemplo, apresentam tempos de duplicação que variam de 0,25 à 1 hora e para as leveduras esse tempo varia de 1,5 a 2 horas (SMITH, 1985). Já células animais de linhagens contínuas (imortalizadas) apresentam tempos de duplicação que podem variar de 12 a 24 horas (FRESHNEY, 2005).

Com relação à sensibilidade ao cisalhamento, células animais são muito mais sensíveis do que micro-organismos, o que inviabiliza a utilização de altas frequências de agitação e limita a transferência de oxigênio para o meio de cultura

(TONSO, 2000). Além disso, células cultivadas em suspensão aderem facilmente a bolhas de ar. Em cultivos nos quais se utiliza aspensor como dispositivo para promover a transferência de oxigênio para o meio de cultura, a ruptura das bolhas de ar na superfície gera tensões de cisalhamento suficientemente altas para destruir células nessa região (MA *et al.*, 2004).

Tabela 3.1 – Comparação entre diferentes sistemas de expressão de proteínas recombinantes. Adaptado de (CHA *et al.*, 2005)

Características	Organismo			
	Bactéria (<i>E. coli</i>)	Levedura (<i>Pichia pastoris</i>)	Célula de inseto	Célula de mamífero
Velocidade específica de crescimento	Muito alta	Alta	Lenta	Lenta
Produtividade	Muito alta	Alta	Alta	Baixa
Complexidade do meio de cultivo	Baixa	Baixa	Alta	Alta
Técnicas de cultivo	Muito fácil	Fácil	Difícil	Muito difícil
Susceptibilidade ao cisalhamento	Baixa	Baixa	Muito alta	Alta
Custo de produção	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Glicosilação simples	Não	Sim	Sim	Sim
Glicosilação complexa	Não	Não	Sim ^a	Sim
Funcionalidade das proteínas eucarióticas produzidas	Pobre	Boa	Muito boa	Muito boa

^a O padrão de glicosilação é diferente daquele das células de mamíferos.

Processos com células animais possuem, no entanto, vantagens sobre aqueles com micro-organismos, sendo a principal delas a qualidade da glicosilação produzida em proteínas heterólogas, tornando-as mais adequadas para a utilização como biofármacos. Entre os micro-organismos, as bactérias não realizam modificações pós-tradução como N- e O-glicosilações, acilação de ácidos graxos, fosforilação e pontes dissulfeto, modificações frequentemente necessárias para o enovelamento adequado das estruturas secundária, terciária e quaternária e para a manutenção das características funcionais da proteína de interesse (Tabela 3.2). A glicosilação de uma proteína requer inúmeras etapas de processamento realizadas no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático, estruturas presentes apenas em células eucarióticas (BUTLER, 2008). A falta de modificações pós-tradução pode

afetar não só a função como também a solubilidade, a estabilidade, a meia-vida e a resistência a proteases da proteína produzida (YIN *et al.*, 2007).

Tabela 3.2 – Caracterização de sistemas de expressão quanto a níveis de expressão e modificações pós-tradução (YIN *et al.*, 2007)

Modificações pós-tradução	Sistema de expressão			
	<i>E. coli</i>	Levedura	Célula de inseto	Célula de mamífero
Enovelamento	Re-enovelamento usualmente necessário	Re-enovelamento pode ser necessário	Enovelamento adequado	Enovelamento adequado
N-glicosilação	Não	Alto teor de manose	Simples, sem ácido siálico	Sim
O-glicosilação	Não	Sim	Sim	Sim
Fosforilação	Não	Sim	Sim	Sim
Acetilação	Não	Sim	Sim	Sim
Acilação	Não	Sim	Sim	Sim
γ -Carboxilação	Não	Não	Não	Sim
Nível de Expressão	Alto	Baixo-Alto	Baixo-Alto	Baixo-Moderado

Entre leveduras, *Pichia pastoris* é comumente utilizada como sistema de expressão de proteínas terapêuticas não glicosiladas, como insulina e fator de crescimento (DUROCHER; BUTLER, 2009), e até o ano 2000 mais de 200 proteínas de vírus, bactérias, fungos, animais, plantas e humanos haviam sido expressas com sucesso utilizando essa levedura como plataforma (CREGG *et al.*, 2000). Entretanto, o padrão de N-glicosilação produzido por leveduras difere daquele produzido por células de mamíferos (Tabela 3.2), alterando a meia-vida e a imunogenicidade da proteína produzida (FERRER-MIRALLES *et al.*, 2009).

Entre células animais, células de inseto apresentam padrão de glicosilação limitado se comparadas a células de mamífero. De modo geral, células de inseto são incapazes de sintetizar N-glicanos do tipo complexo contendo lactosaminas sialiladas ou O-glicanos sialilados (Tabela 3.2). A vantagem do uso de células de inseto reside nos níveis altos de expressão e velocidade de crescimento em cultura (BUTLER, 2008). A limitação quanto à glicosilação em células de inseto vem sendo superada através da transformação de linhagens celulares de lepidópteros com

genes de mamíferos expressos de maneira constitutiva, conferindo à célula transformada a capacidade de produzir proteínas recombinantes humanizadas (JARVIS, 2003).

3.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura para cultivos de células animais deve conter todas as substâncias necessárias para o anabolismo e catabolismo celular que não são sintetizadas, além de proporcionar condições de pH e osmolalidade ideais para a sobrevivência e crescimento celular. Ele deve conter nutrientes essenciais para a síntese de novas células, substratos para a realização do metabolismo celular, além de compostos que desempenhem funções fisiológicas, catalíticas ou que atuem como cofatores. Assim, é necessário que o meio possua, entre outras substâncias específicas para determinadas linhagens celulares, sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

Segundo Kretzmer (2002), o maior marco na direção de viabilizar cultivos em larga-escala de células animais foi alcançado por Earle e Eagle, que analisaram extensivamente os requerimentos nutricionais de células cultivadas *in vitro* e em 1955 desenvolveram o meio mínimo essencial de Eagle (EAGLE, 1955). Era necessária, no entanto, a adição de soro sanguíneo, que contém aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas, hormônios, lipídeos e minerais para que as células crescessem adequadamente.

O soro sanguíneo, usualmente de origem fetal bovina, tem em sua composição proteínas da matriz extracelular, fundamentais para o ancoramento de linhagens celulares aderentes, e componentes que conferem às células proteção biológica (antitoxinas, antioxidantes, antiproteases) e proteção mecânica, necessária para cultivos em tanques agitados e com aeração (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

No entanto, apesar de ser fonte de grande parte de nutrientes para as células, a utilização do soro dificulta a recuperação e purificação de bioprodutos, devido à presença dos componentes citados, alguns dos quais não definidos. O soro também pode ser fonte de contaminação por parasitas, bactérias, fungos, micoplasmas e vírus e conter imunoglobulinas tóxicas e/ou inibidoras do crescimento celular. É, frequentemente, o componente de maior custo no meio de cultura, podendo atingir valores da ordem de 80% do seu custo total (AUGUSTO; OLIVEIRA, 2001).

O soro fetal bovino é também um dos principais agentes protetores do cisalhamento celular presente no meio de cultura de modo que, ao se formular um meio de cultura livre de soro, é necessário adicionar outros suplementos que sejam capazes de desempenhar o mesmo papel, como metil-celulose, polietileno glicol ou Pluronic F-68. (THARMALINGAM *et al.*, 2008)

O Pluronic F-68 é um surfactante sintético não-iônico, com massa molecular média de aproximadamente 8,4 kDa constituído de um centro hidrofóbico de cadeias de óxido de propileno e caudas hidrofílicas de óxido de etileno. Seu efeito protetor ocorre pela redução da interação célula-bolha de ar (MICHAELS; MALLIK; PAPOUTSAKIS, 1996) através da diminuição da tensão superficial, o que diminui a energia liberada durante o rompimento das bolhas na interface líquido-ar (MA *et al.*, 2004). O Pluronic F-68 pode ainda ser relacionado com o aumento da resistência da membrana celular; Zhang *et al.* (1992) mostraram que a tensão necessária para romper as células aumentava significativamente na presença do surfactante.

O envolvimento de empresas biotecnológicas no cultivo de células animais levou ao desenvolvimento de vários meios livres de soro, tais como o PFHM II (Gibco) desenvolvido para o cultivo de hibridomas, o CCM5 e o SFMTransfx-293 (Hyclone) para o cultivo de células CHO e HEK 293, o SF 900 II (Gibco) e o Insect-XPRESS (Lonza) para o cultivo de células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 e Sf21. Apesar de livres de soro, os meios citados não são quimicamente definidos e utilizam em sua formulação hidrolisados proteicos como alternativa. Dentre os meios quimicamente definidos destacam-se o CD Hybridoma (Hyclone) para o cultivo de hibridomas, o CDM4HEK293 (Hyclone) para o cultivo de células HEK 293 e o EX-CELL[®] CD CHO (Sigma-Aldrich) para o cultivo de células CHO.

Taticek *et al.* (2001) mostram, no entanto, que mesmo que um meio seja otimizado para o máximo crescimento de uma linhagem celular, outro meio de cultura pode oferecer uma condição mais favorável para a produção de proteína. Um exemplo é a otimização de meios de cultura livres de soro visando à produção da glicoproteína do vírus da raiva por células de *Drosophila melanogaster* – apesar de cultivos em meio TC-100 otimizado (GALESI *et al.*, 2008; GALESI; PEREIRA; MORAES, 2007) alcançarem apenas 50% da concentração celular obtida em meio IPL-41 otimizado (BATISTA *et al.*, 2008), a produção específica de proteína naquele meio foi aproximadamente 5 vezes maior.

3.2.2 Células de inseto

Células de inseto, devido ao fato de terem sua origem em tecidos de órgãos específicos ou tecidos embrionários não diferenciados, crescem aderidas na forma de monocamada ou podem ser facilmente adaptadas a cultivos em suspensão (Tabela 3.3). Tal versatilidade, em contraste com a maioria das linhagens de células de mamífero, aumenta a possibilidade de escolha entre diferentes tipos de biorreatores ou estratégias de cultivo. Ainda, a inibição do crescimento por contato é baixa ou ausente para células de inseto e linhagens aderentes geralmente não requerem tripsinização, desprendendo-se do suporte sólido sob leve agitação, diferentemente do observado em diversas linhagens de células de mamífero (LÉO *et al.*, 2008).

Células de inseto são ainda mais sensíveis ao cisalhamento do que células de mamífero – McQueen e Bailey (1989) demonstraram que, para hibridomas, a tensão de tolerância crítica é da ordem de 150 N m^{-2} . Tramper *et al.* (1986) demonstraram que células de inseto *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21 tem sua viabilidade afetada quando expostas a tensões de cisalhamento da ordem de 1 N m^{-2} . Para efeito de comparação, o limite de tolerância ao cisalhamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UG5 está entre 1292 N m^{-2} e 2770 N m^{-2} (LANGE; TAILLANDIER; RIBA, 2001). Ainda que não letais, níveis baixos de tensão de cisalhamento refletem em

mudanças na fisiologia celular, alterando a velocidade específica de crescimento, a morfologia, o metabolismo e a expressão gênica em questão de minutos (NOLLERT; DIAMOND; MCINTIRE, 1991).

Tabela 3.3 – Características de culturas de células de inseto e de células de mamífero (LÉO *et al.*, 2008)

Características	Célula de inseto	Célula de mamífero
Manutenção da linhagem celular	Relativamente simples	Mais difícil
Versatilidade suspensão/adesão	Sim	Adaptação à suspensão possível em alguns casos
Imortalidade	Sim	Apenas linhagens celulares transformadas
Inibição do crescimento por contato	Baixa ou ausente	Sim, exceto para algumas linhagens transformadas e linfoblastóides
Desprendimento da superfície do suporte	Leve agitação	Tripsinização
Sensibilidade a mudanças no pH, oxigênio dissolvido, temperatura e osmolalidade	Relativamente baixa	Relativamente alta
Dependência da concentração de inóculo para crescimento	Sim	Sim

A forma mais comumente utilizada para expressar proteínas recombinantes em células de inseto é a infecção destas por baculovírus, constituindo o sistema de expressão conhecido como célula de inseto-baculovírus (IC-BEV) (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Drugmand *et al.* (2012), comparando cultivos utilizando células de mamífero e células de inseto, listam como vantagens da utilização do sistema IC-BEV: a produção de proteínas recombinantes em um curto espaço de tempo devido à natureza transiente do processo; a simplicidade e a segurança da construção e manipulação de baculovírus recombinantes, por serem patogênicos apenas para células de inseto; e a ausência de oncogenes humanos em células de inseto. Contudo, o sistema IC-BEV é um sistema transiente lítico. A lise celular no final do processo pode comprometer a quantidade e a qualidade da proteína recombinante produzida, encarece e dificulta o processo de *downstream* e limita as estratégias de cultivo, em particular processos contínuos. Além disso, as

modificações pós-tradução da proteína recombinante produzida pelas células de inseto são diferentes daquelas produzidas por células de mamífero.

A eficácia, a segurança e o custo de produção relativamente baixo indicam que o cultivo de células de inseto é particularmente interessante para a produção de *virus-like particles* (VLPs), utilizando tanto o sistema IC-BEV (SCHMIDT, 2004; SCHMIDT; HOFFMAN, 2002) quanto células de inseto estavelmente transformadas por vetores plasmidiais (CLEMENTS *et al.*, 2010). Este tipo de abordagem torna-se interessante para a produção de vacinas contra vírus cuja replicação é impossível utilizando a tecnologia de cultivo celular, como o vírus da hepatite e o papiloma vírus humano (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

A glicosilação de proteínas recombinantes produzidas em células de inseto diferente daquela produzida por células de mamíferos ainda é considerada uma desvantagem. No entanto, para a produção de vacinas, a falta de glicosilação mais parecida com aquela produzida em células humanas não representa um problema, podendo inclusive melhorar a resposta imune à vacina (SCHMIDT; HOFFMAN, 2002).

Em resumo, células de inseto utilizadas como sistema de expressão de proteínas heterólogas superam deficiências importantes dos organismos procariotos como a falta de modificações pós-tradução importantes, e tem como vantagens em relação às células de mamífero a facilidade e a versatilidade de cultivo e níveis mais altos de expressão aliado a menores custos (FERNANDEZ; HOEFFLER, 1999; VERMA; BOLETI; GEORGE, 1998).

3.2.2.1 A célula S2

Em estudos de expressão gênica, as linhagens celulares de *Drosophila melanogaster* mais frequentemente empregadas são as Schneider S2 e Schneider S3 (CHERBAS; MOSS; CHERBAS, 1994).

A linhagem Schneider S2 foi estabelecida a partir de culturas primárias de embriões em estágio tardio de desenvolvimento (20 a 24 h) de *Drosophila*

melanogaster (SCHNEIDER, 1972). As células dessa população heterogênea foram cultivadas durante aproximadamente 3 meses, tornando-se células imortalizadas não tumorais. A linhagem celular resultante foi descrita como tendo características de tecido epitelial; entretanto, estudos mais recentes indicam que a linhagem tem provavelmente origens hematopoiéticas (KIRKPATRICK; SHATZMAN, 1999).

Apesar da ampla utilização do sistema IC-BEV para a expressão de proteínas heterólogas por células de inseto, a linhagem S2 foi desenvolvida visando um sistema de expressão permanente de proteínas utilizando plasmídeos (de expressão constitutiva ou induzida), o que não provoca lise celular. Essa linhagem pode ser transfectadas de maneira estável, utilizando um plasmídeo de seleção resistente a uma droga e um ou mais plasmídeos de expressão contendo o gene de interesse (GALESI *et al.*, 2008). Produtos biológicos que já foram expressos por essas células incluem anticorpos (KIRKPATRICK *et al.*, 1995), receptores (BROECK *et al.*, 1995; MILLAR *et al.*, 1995; PERRET *et al.*, 2003; TORFS *et al.*, 2000; TOTA *et al.*, 1995), enzimas (BANKS; HUA; ADANG, 2003; GIBSON *et al.*, 1993), inibidores tumorais (JEON *et al.*, 2003; VALLE *et al.*, 2001), fatores de crescimento (LEE *et al.*, 2000) e antígenos virais (BACHMANN *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2010; DEML; WOLF; WAGNER, 1999; YOKOMIZO *et al.*, 2007).

Uma vantagem importante da célula S2 para produção de proteínas recombinantes em larga escala é sua versatilidade com relação aos promotores utilizados nos vetores de expressão, pois é possível utilizar tanto promotores constitutivos como indutíveis. Uma característica notável das células S2 é a possibilidade de integração de mais de 1000 cópias do cassete de expressão num único evento de transfecção-seleção, não requerendo portanto longos períodos de amplificação do plasmídeo e seleção de clones para se estabelecer uma linhagem com altos níveis de expressão (DEML; WOLF; WAGNER, 1999).

Atualmente as células S2 vem sendo utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes (CLEMENTS *et al.*, 2010; DEML; WOLF; WAGNER, 1999; JORGE *et al.*, 2008; LEMOS *et al.*, 2009) também pelo fato de apresentarem vantagens como velocidades específicas de crescimento relativamente altas, não requererem controle de pH e utilizarem meio de cultura sem a necessidade de aditivos caros.

3.2.2.2 A linhagem de células S2 co-transfectadas para expressão de GPV

Em 2007, pesquisadores do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan construíram com sucesso uma linhagem de células de *Drosophila melanogaster* denominada S2AcGPV (YOKOMIZO *et al.*, 2007). O cDNA que codifica o gene da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) foi clonado num plasmídeo de expressão sob o controle do promotor constitutivo da actina (pAcRVGP – Figura 3.2), o qual foi co-transfectado em células S2 em conjunto com um plasmídeo de seleção por higromicina (pCoHygro). Populações de células S2 policlonais transformadas foram isoladas após 3 semanas, em cultivo com higromicina.

Figura 3.2 – Representação esquemática do plasmídeo de expressão constitutiva da proteína recombinante do vírus da raiva pAcRVGP (YOKOMIZO *et al.*, 2007).

As populações transformadas apresentaram velocidades específicas de crescimento inferiores e menor consumo de substrato em relação à célula não transformada (S2). Como avaliado por PCR, as populações selecionadas por cultivo em higromicina mostraram terem integrado o cDNA da GPV em seu genoma e transcreverem constitutivamente o cDNA em mRNA. A proteína recombinante pôde então ser detectada, com peso molecular adequado, nos lisados celulares (YOKOMIZO *et al.*, 2007).

Ensaio de imunização de camundongos foram realizados, utilizando a proteína recombinante produzida por células S2AcGPV, com grupos controle não

imunizados e imunizados com vacina contra a raiva padrão (BR006). Os ensaios mostraram índice de 80% de indivíduos sobreviventes após 14 dias de infecção intracerebral com vírus CVS (*challenge virus standard*) no grupo de teste com GPV recombinante, contra zero indivíduos do controle não imunizado e 100% do controle imunizado com vacina padrão (YOKOMIZO *et al.*, 2007).

A linhagem S2AcGPV tem sido alvo de estudos recentes que abordam diferentes temas como formulações de meios de cultura (BATISTA *et al.*, 2008; GALESI, 2007; GALESI *et al.*, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2008), respiração (PAMBOUKIAN *et al.*, 2008), metabolismo (SWIECH *et al.*, 2008a; SWIECH *et al.*, 2008c), otimização da produção da glicoproteína do vírus da raiva (SWIECH *et al.*, 2008b; VENTINI *et al.*, 2010) e estudos cinéticos em frascos tipo *Schott* e biorreator (BATISTA *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2009; BOVO *et al.*, 2008; VIEIRA, 2010).

3.2.3 Células de mamífero

A produção de proteínas recombinantes ao longo das últimas décadas tem sido de grande importância, principalmente no desenvolvimento de produtos com aplicação médica. Nessa categoria, moléculas complexas que necessitam de modificações pós-tradução para que sejam plenamente funcionais compõem a maior parte das proteínas produzidas (BALDI *et al.*, 2007). Tais modificações são executadas com precisão apenas por células de mamíferos, motivo pelo qual elas se tornaram a principal plataforma de expressão de proteínas recombinantes (WURM, 2004). As linhagens de células de rim de *hamster* neonato (BHK – *baby hamster kidney*) e de células de ovário de *hamster* chinês (CHO – *chinese hamster ovarium*), se tornaram as principais plataformas de expressão utilizadas na indústria farmacêutica principalmente devido ao padrão de glicosilação dessas células ser similar àquele observado em seres humanos (BUTLER, 2008).

O ativador plasminogênico tecidual (t-PA – *tissue plasminogen activator*) (Activase®; Genentech, S. Francisco, EUA) foi a primeira proteína terapêutica produzida por células recombinantes de mamífero a ser aprovada no mercado, em

1987, utilizando células CHO (DE JESUS; WURM, 2011). Atualmente, dos 27 biofármacos que obtiveram aprovação pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) entre janeiro de 2008 e junho de 2011, 12 são produzidos em cultura de células de mamífero, ou cerca de 45% do total de biofármacos aprovados. Quanto ao impacto econômico que esse número representa, dois terços da receita gerada pelos biofármacos mais vendidos em 2007 (Tabela 3.4) vem de produtos produzidos através da cultura de células de mamífero (ZHU, 2012).

Em culturas em suspensão, as células CHO são as mais utilizadas para a produção de proteínas recombinantes devido à sua adaptação para crescer em suspensão. Além dela, células derivadas de mieloma de camundongo NS0, células BHK, células de rim embrionário humano (HEK-293 – *human embryo kidney*) e células derivadas da retina embrionária humana PER-C6 possuem também a capacidade de crescer em suspensão se adaptadas (WURM, 2004) e, portanto, apresentam potencial para produção de proteínas recombinantes através de diferentes estratégias de cultivo.

Além da utilização de células transformadas para a expressão estável de genes, vetores virais e não-virais foram desenvolvidos para possibilitar a incorporação de DNA exógeno pela célula hospedeira e possibilitar a expressão transiente dos mesmos (KERRIGAN *et al.*, 2011).

A escolha do vetor depende da aplicação, da célula hospedeira, da limitação de tempo e da segurança (BALDI *et al.*, 2007). Os métodos de entrega de material genético mediados por vírus, embora sejam mais eficientes, são mais trabalhosos pois requerem receptores vírus-específicos na célula hospedeira, limitando a diversidade de linhagens celulares que podem ser utilizadas (BOLLATI-FOGOLÍN; COMINI, 2008). Em geral, a maior preocupação quanto à utilização de um vetor viral se deve à sua natureza infecciosa. Contudo, a utilização de vetores virais defectivos, que não se replicam, evita este problema e possibilita uma entrega gênica eficiente (LUNDSTROM *et al.*, 2001).

Dentre os vetores virais, o mais utilizado para a expressão transiente em células animais é o *Semliki Forest Virus* (SFV). A escolha desse vetor deve-se principalmente à rápida expressão de grande quantidade de proteína recombinante – após a infecção, a replicação do RNA no citoplasma da célula hospedeira resulta em

quantidades mensuráveis de proteína expressa em 2 horas após o evento de infecção (LUNDSTROM, 2002).

Tabela 3.4 – Biofármacos mais vendidos em 2007 (ZHU, 2012)

Produto	Receita US\$ (M)	Aprovado	Fabricante	Sistema de expressão	Indicação
EPOs	10.794	1989	Amgen, Roche, J & J	Mamífero	Anemia
Insulinas	10.132	1982	Eli Lilly, Novo Nordisk, Sanofi-Aventis,	<i>E. coli</i>	Diabetes
IFNs	7.455	1993	Schering-Plough, Roche, Biogen-Idec, Bayer-Schering, Merck-Serono	<i>E. coli</i> , levedura	Infecção viral, câncer
Enbrel	5.275	1998	Amgen, Wyeth	Mamífero	Artrite reumatoide
Remicade	4.948	1998	J & J, Schering-Plough	Mamífero	Artrite reumatoide
Rituxan	4.600	1997	IDEC, Genentech, Roche	Mamífero	Linfoma Não-Hodgkin e LLC
Neupogen / Neulasta	4.277	1998 / 2002	Amgen	<i>E. coli</i>	Mielossupressivo
Fatores de coagulação	4.168	1997	Novo Nordisk, Wyeth, Bayer, Baxter	Mamífero	Hemofilia
Herceptina	4.046	1998	Genentech and Roche (Trastuzumab)	Mamífero	Câncer de mama
Lovenox	3.605	2007	Sanofi-Aventis	N/D	Aterosclerose coronariana
Avastin	3.424	2004	Genentech e Roche (Bevacizumab)	Mamífero	Câncer
Humira	3.000	2002	Abbott Laboratories (Adalimumab)	Mamífero	Artrite reumatoide
Hormônios de crescimento	2.545	1985	Pfizer, Novo Nordisk, Eli Lilly, Serono, Roche/Genentech	<i>E. coli</i>	Deficiência hormonal
Prevnam / Prevenar	2.439	2002	Wyeth	Bactéria	Prevenção de doença pneumocócica
Gardasil	1.481	2006	Merck	Levedura	Prevenção de câncer vaginal
Erbitux	1.336	2004	Merck-Serono, BMS	Mamífero	Câncer
Lucentis	1.219	2006	Genentech, Novartis (Ranibizumab)	<i>E. coli</i>	Degeneração macular
Synagis	1.200	1998	MedImmune	Mamífero	Infecção respiratória sincicial
Cerezyme	1.144	1994	Genzyme	Mamífero	Doença de Gaucher

Benmaamar *et al.* (2009) utilizaram o *Semliki Forest Virus* recombinante contendo o RNA codificador da glicoproteína do vírus da raiva (SFV-RVGP) e estudaram a expressão da GPV em células BHK-21, HEK-293, Huh-7 (hepatoma humano) e VERO infectadas com o vetor. Células BHK-21 apresentando a GPV na membrana foram detectadas 4 horas após a infecção e os níveis máximos de expressão foram alcançados no período entre 24 e 48 horas após a infecção ($18\text{--}22 \mu\text{g } 10^{-7} \text{ céls}^{-1}$), consideravelmente maiores que os observados por Ventini *et al.* (2010) ($0,76\text{--}2 \mu\text{g } 10^{-7} \text{ céls}^{-1}$) e por Swiech *et al.* (2008b) ($0,42\text{--}0,57 \mu\text{g } 10^{-7} \text{ céls}^{-1}$). Células Huh-7 expressaram GPV em níveis mais baixos, enquanto que as células VERO e HEK-293 não expressaram a glicoproteína, exemplificando as particularidades de cada plataforma de expressão quando da utilização de vetores virais.

3.2.3.1 A célula BHK-21

Atualmente, a célula BHK-21 é utilizada para a produção de vacinas e para a produção de proteínas recombinantes (DUROCHER; BUTLER, 2009). Os fatores de coagulação VIIa (NovoSeven[®]) e VIII (Kogenate[®]) são provavelmente os mais importantes. Para esses produtos, a perfusão é a estratégia de cultivo adotada – a composição do meio de cultura e a taxa de diluição são alvos de pesquisa visando a otimização do processo (CRUZ; MOREIRA; CARRONDO, 1999; GESERICK *et al.*, 2000; KALLEL *et al.*, 2002; KALLEL *et al.*, 2003).

A célula BHK-21 apresenta valores típicos de velocidade específica máxima de crescimento entre 0,18 e 1,3 dia⁻¹ em diferentes meios de cultura (KALLEL *et al.*, 2002) e concentração celular máxima entre 0,6 e 2×10^6 céls mL⁻¹ em cultivos em quimiostato (CRUZ *et al.*, 2002) e entre 2×10^6 céls mL⁻¹ (CRUZ; MOREIRA; CARRONDO, 1999) e 20×10^6 céls mL⁻¹ (NIVITCHANYONG *et al.*, 2007) em cultivos em perfusão.

3.3 METABOLISMO DE CÉLULAS ANIMAIS

Visando à produção de proteínas recombinantes por células animais, as condições de cultivo precisam ser otimizadas para suportar altas concentrações celulares. As necessidades nutricionais da célula precisam ser atendidas, e algumas delas são particulares para cada linhagem celular.

Em geral, as células animais em cultivo obtêm energia de duas fontes principais: glicose e glutamina. Principal fonte de carbono e energia em cultivos de células animais, a glicose é metabolizada tanto através da via das pentoses-fosfato, para a obtenção de nucleotídeos e poder redutor para biossíntese, quanto através da glicólise e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, gerando intermediários metabólicos e energia para crescimento e manutenção celular (ZHANG, 2009). A glutamina, por sua vez, é um importante bloco estrutural para o metabolismo celular, sendo a principal fonte de nitrogênio para a síntese de pirimidinas e purinas, açúcares aminados, NAD e asparagina (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008), e um precursor de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (BUTLER, 2004).

3.3.1 Metabolismo de carboidratos

Em células animais, a glicose pode ser armazenada na forma de glicogênio, oxidada a piruvato para a produção de ATP e metabólitos intermediários, ou oxidada através da via das pentoses-fosfato (AMABLE; BUTLER, 2008). Além de ser a mais importante fonte de energia para o metabolismo celular, a glicose é um precursor versátil, capaz de suprir a rede metabólica com intermediários importantes para reações de biossíntese.

A membrana citoplasmática é praticamente impermeável a moléculas polares como a glicose. O transporte do carboidrato acontece por difusão facilitada, uma vez que a concentração de glicose no citosol é muito baixa em decorrência de sua rápida fosforilação promovida pela ação de hexoquinases, gerando glicose-6-fosfato, ou

através de simporte com sódio, baseado no gradiente de concentração do íon através da membrana plasmática (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008).

No citosol, glicose-6-fosfato pode seguir por duas vias: a glicólise ou a via das pentoses-fosfato (Figura 3.3). A glicólise ocorre totalmente no citosol e não necessita de oxigênio, gerando duas moléculas de ATP, duas moléculas de NADH e duas moléculas de piruvato. Já através da via das pentoses-fosfato, a célula é capaz de gerar ribose-5-fosfato como precursor para a síntese de ácidos nucleicos, poder redutor para a síntese de lipídios e ácidos nucleicos na forma de NADPH e gliceraldeído-3-fosfato, intermediário da via glicolítica.

Figura 3.3 – Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato.

A conversão de gliceraldeído-3-fosfato a piruvato depende da disponibilidade de NAD^+ citoplasmático e, portanto, NADH deve ser constantemente oxidado a

NAD⁺. Células em cultura apresentam frequentemente um metabolismo celular desregulado, no qual a glicólise é processada a taxas muito mais altas do que o necessário. Quando a concentração de glicose disponível é não limitante, a velocidade de consumo desse substrato é muito mais alta do que a necessária para a manutenção do crescimento celular (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008). Dessa forma, o NAD⁺ que precisa ser regenerado provém majoritariamente do NADH acumulado, que é oxidado na conversão de piruvato a lactato, metabólito que em altos níveis é tóxico para a célula (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008).

Cruz, Moreira e Carrondo (1999), realizando cultivos em quimiostato de células BHK-21A com diferentes concentrações de glicose no meio de alimentação, observaram que as velocidades do consumo do carboidrato foram de 0,11 e 0,01 mmol (10⁹ céls)⁻¹ h⁻¹ quando as concentrações de glicose residual eram 1,24 e 0,14 mM respectivamente. Através da análise de fluxos metabólicos, foi possível determinar que na situação de alimentação com concentração mais alta de glicose, 69% do carboidrato era convertido a piruvato, sendo a maior parte deste convertida a lactato. Já na situação de alimentação com uma concentração mais baixa de glicose, 86% do carboidrato foi convertido a piruvato e 66% deste foi metabolizado no TCAc.

O padrão de formação de lactato varia com a linhagem celular – células de inseto (Sf9) não acumulam uma quantidade significativa de lactato (BÉDARD; TOM; KAMEN, 1993; DOVERSKOG *et al.*, 1997; DREWS *et al.*, 2000; FERRANCE; GOEL; ATAAI, 1993; ÖHMAN; LJUNGGREN; HÄGGSTRÖM, 1995). Através da quantificação do fluxo metabólico de células Sf-9, Bhatia *et al.* (1997) demonstraram que essas células processam o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCAc) com eficiência, transportando o piruvato para o interior da mitocôndria e oxidando-o. Neermann e Wagner (1996) cultivando células Sf-9 e Sf-21 verificaram um fator de conversão glicose a lactato, $Y_{LAC/GLC}$, igual a 0,02 mol mol⁻¹ para as duas linhagens. Isso evidencia o porquê de células de inseto não produzirem quantidades significativas de lactato, a não ser sob estresse anóxico, ao contrário de células BHK-21. Estas, por sua vez, apresentam taxas de consumo de glicose e formação de lactato equivalentes, sendo apenas uma pequena fração da glicose consumida

pela célula direcionada, na forma de piruvato, para o TCAC, resultando num fator de conversão $Y_{LAC/GLC}$ igual a 1,31–1,55 mol mol⁻¹ (NEERMANN; WAGNER, 1996).

Na presença de oxigênio e no interior da mitocôndria, piruvato é oxidado a gás carbônico e água através de uma série de reações que em conjunto são conhecidas como ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCAC – *tricarboxylic acid cycle*), ilustrado na Figura 3.4 juntamente com as principais reações anapleróticas. O TCAC é responsável tanto pela completa oxidação dos produtos da glicólise, quanto pela completa oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos. A principal função do TCAC é prover diferentes compostos necessários para o anabolismo celular e gerar a maior parte da energia celular (AMABLE; BUTLER, 2008).

Figura 3.4 – Esquema do ciclo dos ácidos tricarboxílicos vinculado ao metabolismo de glutamina (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRO, 2008).

3.3.2 Metabolismo de glutamina

Em cultura de células animais, a glutamina é o mais importante entre todos os aminoácidos. Trata-se da principal fonte de nitrogênio na biossíntese de purina, pirimidina e aminossacarídeos. Além disso, a amônia produzida pela célula é derivada, principalmente, do grupo amida da glutamina (ZHANG, 2009). Este aminoácido pode ainda ser convertido em glutamato, alanina e aspartato, sendo incorporado às células através de diferentes sistemas inespecíficos de transporte de aminoácidos (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008).

Analogamente à glicólise, o metabolismo da glutamina ocorre através da glutaminólise. Inicialmente, a glutamina é convertida a glutamato, reação catalisada pela enzima glutaminase, ocorrendo a liberação de uma molécula de amônio. Em seguida, o glutamato pode ser desaminado a alfa-cetoglutarato (α -KG) pela glutamato desidrogenase (GDH), liberando uma segunda molécula de amônio. O α -KG é incorporado ao TCAC, podendo gerar outros intermediários metabólicos (Figura 3.4). A glutamina metabolizada via GDH pode ser completamente oxidada a CO_2 pela enzima málica mitocondrial (EMm, Figura 3.4) gerando até 27 mols de ATP por mol de glutamina. Alternativamente e mais frequentemente, o esqueleto carbônico da glutamina sai da mitocôndria na forma de malato e é posteriormente convertido a piruvato pela via conhecida como transportadora de malato (*malate shunt*) (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008). A via transportadora de malato foi verificada em células de mamíferos comumente utilizadas na indústria como hibridomas, CHO e BHK (CRUZ; MOREIRA; CARRONDO, 1999; VRIEZEN; VAN DIJKEN, 1998).

O glutamato pode também ser metabolizado pelas vias aminotransferases (Ala-TA e Asp-TA, Figura 3.4). Nessas vias o glutamato também é convertido a α -KG, mas a molécula de amônio liberada é transferida para o oxaloacetato formando aspartato, ou para o piruvato formando alanina. As vias aminotransferases geram apenas 9 mols de ATP por mol de glutamina e são uma alternativa para balancear a produção excessiva de amônio devido ao rápido consumo de glutamina (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008).

Em células Sf9 cultivadas sob limitação de glicose, a glutamina é metabolizada normalmente pela glutaminólise, com produção de amônio (ÖHMAN; LJUNGGREN; HÄGGSTRÖM, 1995). Por outro lado, em excesso de glicose é produzida alanina, situação em que glutamina é metabolizada por uma via diferente, denominada NADH-GOGAT (glutamina: 2-oxoglutarato amido transferase). O grupo amida da glutamina é transferido para a posição amina do glutamato que sofre transaminação, formando alanina ao invés de amônia (DREWS *et al.*, 2000) (Figura 3.5). A NADH-GOGAT faz parte da do metabolismo de assimilação de nitrogênio em bactérias, leveduras e plantas e não havia sido descrita em células animais até 1992, quando sua presença foi descoberta no bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e posteriormente identificada em células Sf9 (DREWS *et al.*, 2000) .

Figura 3.5 – Esquema simplificado das principais vias do metabolismo em células Sf-9 ilustrando a glicólise, TCAC, glutaminólise e a GOGAT (5). Abreviações: **G6P**, Glicose-6-fosfato; **F1,6P**, Frutose-1,6-bisfosfato; **GAP**, Gliceraldeído fosfato; **DHAP**, Dihidroxiacetona fosfato; **PYR**, Piruvato; **2-OG**, 2-oxoglutarato. Enzimas: **1**, DHAP desidrogenase; **2**, Lactato desidrogenase; **3a**, Piruvato descarboxilase; **3b**, Etanol desidrogenase; **4**, Glutamato-piruvato transaminase; **5**, Glutamato sintase (NADH-GOGAT); **6**, Glutamina sintetase; **7**, Glutaminase; **8**, Glutamato desidrogenase; **9**, Fluxo de carbonos do TCAC de volta para a glicólise. De: DREWS *et al.* (2000).

Bédard *et al.* (1993) verificaram que, em cultivos de células Sf-9, altas concentrações de alanina não são prejudiciais ao crescimento celular. O mesmo grupo, utilizando células Sf-9 infectadas por baculovírus para a expressão de β -galactosidase, verificou que a alanina também não reduz significativamente a concentração de proteína recombinante produzida quando adicionada à cultura infectada. Entretanto, o processo associado à síntese de alanina a partir de glutamina requer um cofator redutor, o que pode de certa forma drenar o poder redutor disponível na célula para outros processos (ÖHMAN; LJUNGGREN; HÄGGSTRÖM, 1995).

Para algumas linhagens de células de mamíferos, a glutamina tem papel fundamental como fonte de energia. Petch e Butler (1994), cultivando o hibridoma murinho CC9C10 recombinante, verificaram que o metabolismo de glutamina foi responsável pela geração de 41% dos requerimentos energéticos da célula, enquanto que a glicose foi responsável pelos outros 59%.

Vriezen *et al.* (1997) cultivaram duas linhagens celulares, um hibridoma (MN12) e um mieloma de camundongo (SP2/0-Ag14), em quimiostato com concentrações de glutamina na alimentação entre 0,5 e 4 mM. Os perfis do cultivo mostram que, nessa faixa de concentração, glutamina é substrato limitante. Em baixas concentrações do aminoácido, as taxas de produção de amônio e lactato foram mais baixas do que aquelas observadas na alimentação com 4 mM de glutamina, comportamento semelhante àquele observado no metabolismo glicolítico, quanto ao aproveitamento da glicose no TCAC e à geração de lactato.

O metabolismo de glutamina em cultivos de células animais leva, em geral, ao acúmulo de amônio, que em concentrações entre 2 e 4 mM pode ser inibitório ao crescimento celular (AMABLE; BUTLER, 2008; GÓDIA; CAIRÓ, 2006).

3.3.3 Metabolismo de outros aminoácidos

Células animais não podem sintetizar as cadeias ramificadas e as estruturas aromáticas de certos aminoácidos (ALTAMIRANO; GÓDIA; CAIRÓ, 2008). Por esta

razão, aminoácidos denominados essenciais devem ser adicionados ao meio de cultivo para assegurar as funções metabólicas das células cultivadas. A velocidade com que a célula consome ou produz aminoácidos depende de fatores como a oferta nutricional, o estado proliferativo e as propriedades específicas da linhagem celular (DOVERSKOG *et al.*, 1997). Eagle (1959) adiciona a glutamina na lista de outros 12 aminoácidos essenciais para a proliferação de fibroblastos de camundongo linhagem L, juntamente a arginina, cistina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, metionina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

Entre os aminoácidos que podem ser sintetizados por células de mamífero estão serina, glicina, alanina, aspartato, asparagina, glutamato e, em princípio, glutamina. Em princípio pois linhagens CHO e BHK possuem atividade da enzima glutamina sintetase (NEERMANN; WAGNER, 1996), enquanto que hibridomas e mielomas não possuem a enzima (BEBBINGTON *et al.*, 1992).

No entanto, Bhatia *et al.* (1997) assumem que a maioria dos aminoácidos utilizados por células de inseto não são sintetizados por elas. Mendonça *et al.* (1999) verificaram ainda que a suplementação de metionina e tirosina no meio de cultura retardou a morte celular em culturas de Sf-9. A adição de metionina e cisteína ao meio de cultura livre de soro fetal bovino IBL10 foi crucial para o crescimento de duas diferentes linhagens de células de inseto (VAUGHN; FAN, 1997). Estes aminoácidos mostraram-se essenciais para o crescimento de células de inseto (MITSUHASHI, 1989¹ apud VAUGHN; FAN, 1997) e é conhecido o papel da cisteína na estabilização de estruturas protéicas por meio da formação de pontes dissulfeto (FREEDMAN, 1984).

Em cultivos em batelada de células Sf-9 conduzidos em biorreator, a cistina (dímero da cisteína e produto da oxidação espontânea desta em meio de cultura) foi o único aminoácido completamente consumido. A exaustão do aminoácido coincidiu ainda com o término da fase exponencial de crescimento e influenciou na concentração final da proteína recombinante (RADFORD; REID; GREENFIELD, 1997). No entanto, em estudos mais recentes, Doverskog *et al.* (1998) mostraram que células Sf-9 conseguem crescer em meio de cultura sem cistina, sintetizando-a

¹ MITSUHASHI, J. Nutritional requirements of insect cells in vitro. In: MITSUHASHI, J. (Ed.) **Invertebrate cell system applications**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1989. v. 1, p. 3-20.

a partir de metionina (rota da cistationa), desde que as células sejam inoculadas entre 47 e 53 h da cultura anterior, evidenciando a dependência do estágio proliferativo da célula. Neste caso, mais metionina é consumida pela célula.

Utilizando células S2AcGPV, Rossi (2008) verificou que glutamina, serina, cisteína e prolina em meio de cultura SF 900 II eram candidatos a substrato limitante do crescimento celular.

De maneira geral, a concentração de aminoácidos no meio de cultivo geralmente limita a concentração celular máxima do cultivo, influencia o crescimento e a viabilidade celular e pode afetar a síntese de certas proteínas (AMABLE; BUTLER, 2008).

3.4 CULTIVO EM BIORREATOR

Existem diferentes formas de se cultivar células animais em um biorreator. Uma primeira classificação é possível de ser feita segundo a homogeneidade do sistema. Reatores em que as células encontram-se uniformemente suspensas em todo o volume de fluido são classificados como homogêneos (biorreatores do tipo tanque agitado, e biorreatores do tipo *air-lift* e *wave*). Reatores em que as células encontram-se imobilizadas num suporte e, portanto, não se encontram uniformemente suspensas no meio de cultura, são classificados como heterogêneos (sistemas de cultivo baseados em microcarregadores, biorreatores de leito empacotado ou fluidizado, biorreator do tipo *hollow fiber* e *roller bottle*) (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008).

Nos reatores heterogêneos, as células permanecem aderidas a uma superfície ou imobilizadas no interior de um leito biocompatível. O meio de cultivo deve ser bombeado através do compartimento onde as células estão imobilizadas para que tenham acesso a nutrientes. Os biorreatores deste tipo foram desenvolvidos para o cultivo de células aderentes e tem como limitação a dificuldade na obtenção de amostras homogêneas da população celular e limitações de ampliação de escala (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008).

A principal vantagem da utilização de biorreatores homogêneos, é a possibilidade de monitoramento e controle do ambiente a que as células estão expostas, de modo mais preciso do que é possível em reatores heterogêneos (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008).

É possível ainda classificar o cultivo segundo seu modo de operação: cultivo descontínuo (batelada ou *batch*), cultivo descontínuo alimentado (batelada alimentada ou *fed-batch*), cultivo contínuo (quimioestado, turbidostato, entre outros) e cultivo contínuo com retenção de células (perfusão) (CASTILHO; MEDRONHO, 2002). Os modos de operação diferem basicamente em como os nutrientes são alimentados e os metabólitos removidos do biorreator, condições que influenciam diretamente no metabolismo celular.

Para a tomada de decisão sobre o melhor modo de operação de um biorreator em escala industrial, alguns fatores característicos da linhagem celular utilizada devem ser observados (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008), como: estabilidade de expressão da proteína de interesse; padrão de produção da proteína (produção associada ao crescimento, parcialmente associada ao crescimento, não associada ao crescimento); tolerância a metabólitos inibitórios e resistência ao cisalhamento.

Processos em batelada, batelada alimentada e perfusão são estratégias de cultivo comumente utilizadas para o cultivo em larga escala de células animais. Já os cultivos em quimioestado são muito utilizados para estudos da fisiologia celular (HAYTER *et al.*, 1993).

3.4.1 Batelada e batelada alimentada

O cultivo realizado em batelada possui uma limitação intrínseca: as células estão expostas a condições que estão em constante mudança, o que, por consequência, limita o pleno crescimento do organismo (CASTILHO; MEDRONHO, 2002). Em geral, a célula apresenta diferentes fluxos metabólicos ao longo de um cultivo em batelada, em função da alta concentração de nutrientes e baixa

concentração de metabólitos no início, situação que se inverte ao longo do cultivo. De fato, no cultivo descontínuo, o esgotamento da oferta nutricional e o acúmulo de metabólitos tóxicos são considerados as principais causas de término da fase exponencial e/ou de morte celular durante a fase de declínio do cultivo (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

De maneira geral, os cultivos em batelada são simples de serem executados e úteis em etapas de propagação de um inóculo para um reator de volume maior. Nessa situação, o cultivo é finalizado no final da fase exponencial de crescimento, resultando numa alta concentração de células crescendo em grande velocidade, de modo que ao inocular essas células em um reator de maior volume, a fase de adaptação seja mínima ou inexistente, reduzindo o tempo improdutivo (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008).

Pamboukian *et al.* (2008) cultivaram três linhagens diferentes de células S2 em biorreator em batelada, utilizando meio de cultura SF 900 II. Células S2 selvagens atingiram a maior concentração celular ($51,2 \times 10^6$ céls mL⁻¹), seguidas pelas S2AcGPV produtoras da glicoproteína do vírus da raiva ($26,6 \times 10^6$ céls mL⁻¹) e pelas S2MtEGFP produtoras da proteína verde fluorescente ($17,8 \times 10^6$ céls mL⁻¹). Os cultivos foram realizados a 28 °C, 100 rpm e oxigênio dissolvido controlado em 40% da saturação com o ar. No ensaio com células S2AcGPV, o teor máximo de GPV, $57 \text{ ng } 10^{-7} \text{ céls}^{-1}$, foi alcançado no oitavo dia de cultivo (PAMBOUKIAN, 2007). A velocidade específica máxima de crescimento para essa linhagem foi de $1,26 \text{ dia}^{-1}$ (PAMBOUKIAN *et al.*, 2008).

Outros trabalhos foram realizados utilizando as células S2AcGPV no sentido de se otimizarem as condições de cultivo. Aguiar (2010), cultivando células S2AcGPV em meio TC100 suplementado com 10 g L^{-1} de glicose e $3,5 \text{ g L}^{-1}$ de glutamina, indicou que as condições ótimas para produção de GPV foram alcançadas quando o cultivo foi realizado a 28 °C e concentração de oxigênio dissolvido controlado em 30%. Nessas condições, foi atingida uma produtividade de $9,1 \mu\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e uma concentração máxima de $1,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína.

Swiech (2007) trabalhou com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, temperatura sub-fisiológica e diferentes frequências de agitação a fim de otimizar a produção de GPV. Células S2AcGPV cultivadas com concentração de oxigênio

dissolvido controlada em 50% da saturação com o ar apresentaram maior velocidade específica máxima de crescimento, maior produtividade específica máxima de GPV e alcançaram maior concentração celular máxima. A diminuição na temperatura de cultivo para 22 °C resultou na obtenção de uma concentração de GPV cerca de 10 vezes superior ($0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$) do que as observadas nos cultivos em frasco agitado a 28 °C ($0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$). Galesi *et al.* (2008) avaliaram o efeito de diferentes impelidores, frequências de agitação e concentrações de Pluronic F68 nos parâmetros fisiológicos da célula, utilizando meio TC100 adaptado (GALESI *et al.*, 2007). A maior concentração de GPV ($0,19 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi alcançada utilizando-se impelidor do tipo *Rushton* de 6 pás, a 100 rpm, 40% de oxigênio dissolvido e adição de 0,1% de Pluronic F-68. Rossi (2008) analisou o comportamento celular em meio de cultura SF 900 II suplementado com os aminoácidos glutamina, cisteína, prolina e serina. A adição dos 4 aminoácidos no meio de cultura SF 900 II refletiu no aumento da concentração celular máxima obtida. Os cultivos realizados a 20 °C apresentaram as menores velocidades específicas de crescimento celular. Porém a concentração máxima de GPV foi superior tanto no cultivo realizado em batelada ($0,35 \mu\text{g mL}^{-1}$) quanto no cultivo realizado em batelada alimentada ($1,15 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O esgotamento de nutrientes disponíveis no meio de cultura vem sendo apontado como a principal limitação de um processo com células de inseto, em relação à obtenção de concentrações celulares mais altas e a maiores rendimentos de produto (DOVERSKOG *et al.*, 1997). Essa limitação é parcialmente contornada pela batelada alimentada, na qual o biorreator é continuamente alimentado por meio de cultura fresco, prolongando o cultivo (CASTILHO; MEDRONHO, 2002). O cultivo se inicia com um volume inferior ao máximo de trabalho do equipamento para que seja possível a adição de nutrientes que são, em geral, soluções concentradas destes compostos (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008). No entanto, em cultivos operados em batelada alimentada, produtos secretados pela célula ficam em suspensão até o final do cultivo, expostos a proteases e glicosidases, podendo ser degradados (GOOCHEE; MONICA, 1990).

Nos cultivos em batelada alimentada, a produtividade é geralmente limitada pelo acúmulo de metabólitos tóxicos como lactato e amônio, que podem inibir o crescimento celular, afetar a viabilidade e a produção da proteína de interesse. Uma

estratégia possível para que o problema seja parcialmente contornado é a manutenção de concentrações mais baixas de nutrientes durante todo o cultivo, ou a substituição de nutrientes como a glicose por outro carboidrato mais lentamente metabolizado (frutose, galactose) e de glutamina por glutamato em células que apresentam a atividade da enzima glutamina sintetase. Cruz, Moreira e Carrondo (2000) cultivaram células BHK-21 produtoras de uma proteína de fusão anticorpo-citocina em concentrações baixas de glicose e glutamina (0,3 e 0,2 mM respectivamente), através da adição controlada desses substratos em batelada alimentada. Como resultado, em relação à batelada tradicional, obtiveram um aumento na velocidade específica máxima de crescimento celular (0,48 contra 0,38 dia^{-1}), concentração celular máxima mais alta ($2,5 \times 10^6$ contra $1,1 \times 10^6$ céls mL^{-1}), maior tempo de cultivo (17 contra 9 dias) e um aumento de 60% na concentração de proteína recombinante. Altamirano *et al.* (2004) propuseram a substituição de glicose por galactose em cultivos de células CHO produtoras de ativador plasminogênico tecidual (t-PA) cultivadas em batelada alimentada, o que permitiu a diminuição na geração de lactato associada a um aumento na viabilidade celular e na produção do biofármaco.

A principal característica da batelada alimentada que faz com que esta seja uma das principais estratégias de cultivo adotada para a produção de diversas proteínas recombinantes na indústria, é a de que a sua produtividade é significativamente maior do que a batelada, ao custo de uma operação levemente mais complexa (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008).

3.4.2 Quimiostato

Cultivos em quimiostato são úteis, na maioria das vezes, em atividades de pesquisa em pequena escala. O processo é caracterizado pela contínua alimentação de meio de cultura fresco e a contínua retirada da suspensão de células, rica em metabólitos e pobre em nutrientes, ambas na mesma vazão, mantendo-se constante o volume do biorreator (CHICO; RODRÍGUEZ; CARDERO, 2008). Neste modo de

cultivo é atingido um estado estacionário, no qual as variáveis como concentração celular, concentração de substrato e produto são mantidas constantes no biorreator ao longo do tempo.

A concentração celular no estado estacionário permanece constante em função da limitação de nutrientes essenciais ao crescimento. A falta desse nutriente, denominado substrato limitante, impede que a concentração celular aumente ao longo do cultivo, pelo fato da constante limitação nutricional, situação semelhante a observada no final de um cultivo em batelada. A concentração celular é controlada pela concentração do substrato limitante, que determina o equilíbrio entre o crescimento celular e a lavagem do biorreator (TONSO, 2000).

Industrialmente, o cultivo em quimiostato permite que sejam obtidos produtos mais uniformes em comparação a cultivos descontínuos, visto que o estado estacionário permite a manutenção das células em um mesmo estado fisiológico por longos períodos de tempo (FACCIOTTI, 2001).

Hayter *et al.* (1993) utilizaram o quimiostato como ferramenta para identificar os fatores que influenciam na glicosilação da proteína recombinante interferon- γ (IFN- γ) produzida por células CHO. Para tanto, foram conduzidos experimentos em diferentes taxas de diluição. Foi observado que o padrão de glicosilação da proteína é constante ao longo de uma faixa extensa de condições fisiológicas, mas é alterada em condições associadas à baixas taxas de diluição.

Hiller *et al.* (1994) avaliaram a resposta fisiológica e a produtividade de anticorpos da célula de hibridoma 4A2 produtora do anticorpo monoclonal IgG2a durante cultivos em quimiostato suplementando o meio de cultura com diferentes concentrações de aminoácidos e vitaminas. A adição de triptofano, isoleucina e valina tiveram um efeito positivo na concentração de células viáveis. A adição do triplo da concentração de cisteína e metionina do meio de cultura foi inibitória para o crescimento celular num primeiro instante. Porém, após atingido o estado estacionário, a concentração celular foi aproximadamente 20% maior que na condição do meio sem suplementação.

Vieira (2010) realizou ensaios em quimiostato com células S2AcGPV em meio SF 900 II, a fim de estabelecer uma metodologia de cultivo contínuo para essa linhagem celular. Foi verificado que, em diferentes vazões específicas, relativamente

distantes da velocidade específica máxima de crescimento celular, o estado estacionário foi atingido com concentrações celulares próximas. A suplementação de glutamina no meio de cultura não alterou a concentração celular máxima atingida no estado estacionário em quimiostato, indicando que este não deve ser o substrato limitante. A suplementação de $0,131 \text{ g L}^{-1}$ de cisteína no meio de cultura levou a um aumento do consumo global dos outros aminoácidos e da concentração celular no estado estacionário (12% maior), indicando que o aminoácido deve ser limitante do crescimento da célula S2AcGPV em meio SF 900 II.

Em um quimiostato, o conhecimento das variáveis associadas ao cultivo em estado estacionário é importante para que possam ser estabelecidas as faixas ideais de operação que maximizem a produtividade do processo (FACCIOTTI, 2001). Adotando-se o modelo de Monod (MONOD, 1942), pode-se observar o comportamento da concentração celular (X), de substrato (S) e da produtividade em células (P_x), através da simulação das equações para essas variáveis no estado estacionário em função da taxa de diluição (D) (Figura 3.6).

Figura 3.6 – Simulação das equações de concentração celular (X), concentração de substrato (S) e produtividade em células (P_x) no estado estacionário de um cultivo em quimiostato utilizando o modelo de Monod, com $\mu_{M\acute{A}X} = 0,5 \text{ h}^{-1}$; $K_S = 0,1 \text{ g L}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0,5$; $S_f = 10 \text{ g L}^{-1}$ (FACCIOTTI, 2001).

É possível observar que a concentração celular permanece em um patamar até valores de D próximos ao $\mu_{M\acute{A}X}$. Para valores de D maiores que o $\mu_{M\acute{A}X}$ ocorre o fenômeno de *wash-out*, ou seja, as células não conseguem crescer na mesma

velocidade em que o meio de cultura é adicionado e retirado do biorreator, ocorrendo um arraste de células. A simulação descrita não leva em consideração o coeficiente de manutenção celular (m_s) (PIRT, 1975) e a velocidade específica de morte celular (k_d), que podem não ser desprezíveis em toda a faixa de taxas de diluição adotada, especialmente em valores muito baixos desta.

3.4.2.1 Balanço de células para o processo contínuo

Para um biorreator operando em modo contínuo sem reciclo celular tem-se que:

$$V \frac{dX}{dt} = F(X_f - X) + V \cdot \mu \cdot X \quad (3.1)$$

onde X (céls mL⁻¹) é a concentração celular no biorreator; X_f é a concentração celular no meio de cultura alimentado; F (L dia⁻¹) é a vazão de alimentação de meio fresco e de retirada de meio de cultura do interior do biorreator; μ (dia⁻¹) é a velocidade específica de crescimento celular e V (L) o volume de trabalho do biorreator. Define-se taxa de diluição como sendo:

$$D = \frac{F}{V} \text{ (dia}^{-1}\text{)} \quad (3.2)$$

Considerando-se que o meio de alimentação não contém células e substituindo-se (3.2) em (3.1), tem-se que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \quad (3.3)$$

No estado estacionário a concentração celular no biorreator permanece constante e, portanto:

$$\mu = D \quad (3.4)$$

Na condição de um processo contínuo, portanto, pode-se alimentar o reator com uma vazão menor ou igual à velocidade específica máxima do crescimento da célula para que não ocorra lavagem do biorreator e, nessa situação, a velocidade específica de crescimento celular é determinada pela taxa de diluição imposta quando atingido o estado estacionário (FACCIOTTI, 2001).

3.4.3 Perfusão

O processo em perfusão não é uma técnica de cultivo moderna. Caracterizado por ser essencialmente um processo em quimiostato equipado com algum sistema de separação e retenção de células, é utilizado desde 1912 (BURROWS, 1912). No cultivo em perfusão as células ficam em parte retidas no biorreator, ao contrário do quimiostato que arrasta células junto com o meio retirado. A fração de células retidas dentro do biorreator no processo em perfusão é função da eficiência do sistema de retenção utilizado.

Cultivos em perfusão podem alcançar concentrações celulares mais altas do que aquelas alcançadas em batelada, ou até em batelada alimentada, e podem ser mantidos por várias semanas ou meses, com a recuperação de produto acontecendo ao longo de todo o período do cultivo. O volume de meio de cultura alimentado ao biorreator por dia pode chegar a várias vezes o volume do biorreator por dia, sendo este mesmo volume retirado para a recuperação do produto (WURM, 2004). O fator VIII anti-hemofílico Kogenate[®] (Bayer, Berkeley, EUA) (BÖDECKER *et al.*, 1994² apud KRETZMER, 2002), cuja demanda mundial é de aproximadamente 150 g ano⁻¹ (WURM, 2004), é produzido por células BHK utilizando a tecnologia de cultivo em perfusão. O fator VIII é provavelmente a maior proteína – formada por 2.332 aminoácidos – já produzida em biorreator. O processo é altamente confiável e

² BÖDECKER, B. G. D. *et al.* Production of recombinant factor viii from perfusion cultures. In: SPIER, R. E.; GRIFFITHS, J. B.; BERTHOLD, W. (Ed.). **Animal cell technology: Products of today, prospects for tomorrow**, Oxford: Butterworth Heinemann, 1994, p. 580-583.

validado pelas agências reguladoras para a contínua produção de fator VIII por um período de 185 dias, período em que são garantidas a perfeita integridade e homogeneidade do biofármaco, que se degrada rapidamente a 37 °C. A vantagem do processo, se comparado ao processo em batelada, é o aumento em 30 vezes da concentração celular, resultando num rendimento 30 vezes superior de fator VIII. A consequência direta é a utilização de um reator de 100–500 L operando em perfusão ao invés de um reator de 5.000 a 15.000 L operando em sucessivas bateladas (BÖDECKER *et al.*, 1994). Em função do volume reduzido do biorreator, a alta taxa de diluição imposta faz com que o produto permaneça no biorreator por um tempo muito reduzido se comparado ao que seria observado em outra estratégia de cultivo, evitando assim a sua degradação.

A maior vantagem do processo em perfusão é, de fato, a obtenção de alta concentração celular e alta produtividade num reator de dimensões reduzidas, quando comparado ao processo em batelada e batelada alimentada (KRETZMER, 2002; VOISARD *et al.*, 2003). A Tabela 3.5 lista características de diferentes tipos de reator e operação.

Tabela 3.5 – Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de processo (KRETZMER, 2002)

Tipo do processo	Vantagem	Desvantagem
Pequena unidade (garrafa T, <i>roller bottle</i> , frascos <i>spinner</i>)	Fácil manuseio; transferência direta do laboratório para a produção; não é necessário procedimento para aumento de escala	Consumo de tempo devido a múltiplas unidades; possibilidade de monitoramento nula ou reduzida; não homogêneo
Reator em batelada, batelada alimentada	Homogêneo; fácil aumento de escala; parcialmente controlável; reposição de nutrientes é possível; planta é flexível para vários produtos	Gradientes ao longo do cultivo; acúmulo de metabólitos tóxicos; perda de viabilidade ao longo do cultivo
Reator em perfusão	Altas concentrações celulares; controlável; possibilita ajuste das condições da cultura; não há gradientes; possibilidade de estado estacionário real; reator principal de dimensões reduzidas	Processo de validação longo e complexo; menor flexibilidade; planta é projetada para o produto

O processo em perfusão combina homogeneidade, controle da oferta nutricional e detoxificação do meio de cultura, devido à constante alimentação e

retirada de meio de cultura. A taxa de diluição imposta varia de acordo com a célula, com a concentração de nutrientes no meio alimentado e com o nível de toxicidade ao qual as células estão expostas (KRETZMER, 2002).

Diversos sistemas de separação vêm sendo utilizados para reter células no biorreator durante cultivos em perfusão. São geralmente baseados em ação centrífuga (centrífugas, hidrociclones), decantação e filtração (*spin-filters*, filtros de fluxo tangencial, filtros dinâmicos), ou separação ultrassônica e dieletoforética (CASTILHO; MEDRONHO, 2002).

Os *spin-filters* foram introduzidos por Himmelfarb *et al.* (1969), visando cultivos celulares em perfusão de alta densidade celular, para células de mamíferos em suspensão. Têm funcionamento baseado no tamanho celular e retêm tanto células viáveis como inviáveis. São cilindros com uma parede porosa e são montados externamente ou dentro do tanque agitado, acoplados ao rotor ou acionados por um motor independente (Figura 3.7). O meio fresco é adicionado ao tanque (fora do *spin-filter*) e o meio de dentro do *spin-filter* é retirado do biorreator. Em função da rotação do equipamento é associada uma eficiência da filtração, sendo o meio de cultura retirado, portanto, menos concentrado de células que o meio externo ao *spin-filter*. A rotação do *spin-filter* ainda evita seu entupimento por criar um fluxo tangencial ao filtro, que arrasta as células retidas.

Figura 3.7 – Esquema de um *spin-filter* interno acoplado ao rotor. Adaptado de Castilho e Medronho (2008).

Avgerinos *et al.* (1990), utilizando um biorreator de 20 L e *spin-filter*, conduziram um processo em perfusão com células CHO produtoras do ativador plasminogênico (rscu-PA). Foram mantidas concentrações celulares entre 60 e 74×10^6 céls mL⁻¹ a uma taxa de diluição de 3 a 4 dia⁻¹. Em 31 dias de cultivo, um total de 51 g de ativador foram produzidos em 1.000 L de meio de cultura.

Em maior escala, Deo, Mahadevan e Fuchs (1996), cultivando um hibridoma e um mieloma para a produção de anticorpos monoclonais, reportaram a utilização de um reator de 500 L com *spin-filter* interno. A produtividade volumétrica em 15 e 35 dias de cultivo foi estimada em aproximadamente 10 vezes a obtida usualmente em cultivos em batelada e batelada alimentada.

O entupimento da malha do *spin-filter* por células aderidas à superfície da malha é a maior preocupação quanto à operação de sistemas equipados com esse dispositivo de retenção celular. Idealmente, processos em perfusão devem operar durante longos períodos de tempo, e a substituição de um *spin-filter* interno durante o cultivo é praticamente impossível, por isso o *spin-filter* deve ser projetado e o cultivo deve ser operado de forma a evitar o entupimento da malha (WOODSIDE; BOWEN; PIRET, 1998).

Uma estratégia comumente utilizada para se evitar esse problema é a utilização de *spin-filter* em cultivos de células aderidas a microcarregadores. Avgerinos *et al.* (1990), que produziram o rscu-PA em processo de perfusão durante 31 dias, utilizaram linhagens celulares aderentes em microcarregadores, de forma a obter agregados de 200 a 600 μm de diâmetro, bem maiores que o diâmetro de poro do *spin-filter* utilizado (120 μm).

3.4.3.1 Balanço de células para o processo em perfusão

Analogamente ao processo contínuo e considerando-se retenção celular (Figura 3.7), tem-se que:

$$V \frac{dX}{dt} = F(X_f - hX) + V \cdot \mu \cdot X \quad (3.5)$$

onde ***h*** é a eficiência do sistema de retenção utilizado, representando a razão entre a concentração de células na saída e dentro do reator (fora do *spin-filter*). Considerando-se que o meio de alimentação não contém células e substituindo-se (3.2) em (3.5) tem-se que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot hX \quad (3.6)$$

Considerando-se que no estado estacionário a concentração celular não varia chega-se a:

$$\mu = D \cdot h \quad (3.7)$$

A eficiência do sistema de retenção ***h*** é um número que varia de 0 (retenção total) a 1 (retenção nula). Quanto maior a eficiência do sistema de retenção, menor é o fator ***h*** e maior poderá ser a taxa de diluição imposta ao processo sem que ocorra *wash-out*.

Na condição de um processo em perfusão pode-se, portanto, operar em taxas de diluição superiores à velocidade específica máxima de crescimento da célula (FACCIOTTI, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA COM CÉLULAS S2

4.1.1 Linhagens celulares e meio de cultura

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares de *Drosophila melanogaster* S2 selvagem e S2AcGPV-2K, produtora da glicoproteína do vírus da raiva (YOKOMIZO *et al.*, 2007), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Imunologia Viral (LIV) do Instituto Butantan.

As células S2 selvagens e as S2AcGPV-2K, ou simplesmente S2AcGPV, foram cultivadas em meio de cultura SF 900 II SFM[®] (Gibco, Auckland, Nova Zelândia). O meio SF 900 II SFM[®] é livre de soro fetal bovino e, portanto, provavelmente utiliza hidrolisado proteico em sua composição. A composição nutricional do SF 900 II SFM[®] não é fornecida pelo fabricante, no entanto a concentração de parte dos componentes foi determinada em trabalhos anteriores e é apresentada na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Concentração de parte dos componentes do meio SF 900 II SFM[®]

(continua)

Componente	Concentração (g L ⁻¹)	Referência
Açúcares		
Glicose	10,00	Swiech, 2007
Sacarose	2,00	Swiech, 2007
Maltose	1,20	Swiech, 2007
Aminoácidos		
Alanina	0,360	Swiech, 2007
Arginina	2,217	Vieira, 2010
Asparagina	1,060	Vieira, 2010
Aspartato	1,161	Vieira, 2010

(conclusão)

Componente	Concentração (g L ⁻¹)	Referência
Aminoácidos		
Cisteína	0,131	Vieira, 2010
Fenilalanina	0,947	Vieira, 2010
Glicina	0,720	Vieira, 2010
Glutamato	2,053	Vieira, 2010
Glutamina	1,936	Vieira, 2010
Histidina	0,410	Vieira, 2010
Isoleucina	0,760	Swiech, 2007
Leucina	0,420	Vieira, 2010
Lisina	0,876	Vieira, 2010
Metionina	1,162	Vieira, 2010
Prolina	0,767	Vieira, 2010
Serina	0,661	Vieira, 2010
Tirosina	0,301	Vieira, 2010
Treonina	0,350	Swiech, 2007
Valina	0,808	Vieira, 2010

Entre os aminoácidos, triptofano não foi possível de ser determinado em função de limitações dos métodos empregados nas análises.

As soluções estoque dos aminoácidos utilizadas para suplementação do meio de cultura (Tabela 4.2) foram preparadas em concentrações próximas à solubilidade máxima a 25 °C, filtradas em membranas 0,22 µm (Millipore, Billerica, EUA) e estocadas em criotubos (TPP, Trasadingen, Suíça) a 4 °C.

Tabela 4.2 – Soluções de aminoácidos utilizadas para suplementação do meio de cultura SF 900 II

Aminoácido	Concentração (g L ⁻¹)
Asparagina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)	20
Cisteína (Merck, Damstadt, Alemanha)	140
Prolina (Sigma)	500
Serina (Sigma)	150

4.1.2 Banco de células e preparo do inóculo

O banco de trabalho foi gerado a partir de um criotubo de células S2AcGPV retirado do nitrogênio líquido e imerso em banho a 28 °C para rápido descongelamento. A suspensão de células foi transferida para um tubo *Falcon* de 15 mL (TPP) com 10 mL de meio de cultura SF 900 II e centrifugado a 1500 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em 5 mL de meio de cultura. Este volume foi então transferido para um *T-flask* de 25 cm² (T25) (TPP), mantido a 28 °C em câmara de incubação B.O.D. (FANEM, São Paulo, Brasil) até que a concentração celular atingisse 5×10^6 céls mL⁻¹, em aproximadamente 3 dias.

Em seguida, foi inoculado um frasco *Schott* de 100 mL e 20 mL de volume de trabalho com concentração celular de $0,5 \times 10^6$ céls mL⁻¹. O frasco foi mantido em incubador rotativo (modelo Innova 4000, New Brunswick Scientific, EUA), a 100 rpm e 28 °C por cerca de 72 horas, de modo que a cultura ainda estivesse em fase exponencial de crescimento. A concentração celular foi então determinada, o volume total de suspensão celular centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspense em 40% (v/v) de meio de cultura SF 900 II, 50% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) e 10% (v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma) de maneira que a concentração celular final fosse de 10×10^6 céls mL⁻¹. Alíquotas de 1 mL dessa suspensão foram então transferidas para criotubos, que posteriormente foram submetidos a -80 °C em recipiente contendo isopropanol para lento congelamento. Após 24 horas, os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido, estágio final de preservação.

Para o preparo do inóculo, um criotubo do banco de trabalho foi descongelado, e o procedimento seguiu como descrito acima até a inoculação do frasco *Schott*. Após 72 horas de cultivo no frasco, a cultura celular, na fase exponencial de crescimento, teve a concentração celular determinada e o sistema de cultivo (Biorreator ou frascos *Schott*) foi inoculado com concentração celular padronizada de $0,5 \times 10^6$ céls mL⁻¹.

4.2 CULTURA COM CÉLULAS BHK

4.2.1 Linhagem celular e meio de cultura

Foram utilizadas neste trabalho, células de rim de hamster neonato linhagem BHK-21 (C13) (Sigma-Aldrich ECACC Cell Lines, Lyon, França) adaptadas ao crescimento em suspensão, gentilmente cedidas pelo Dr. Renaud Wagner da Ecole supérieure de biotechnologie Strasbourg, França.

O meio de cultura para cultivo dessa linhagem tem a seguinte composição por volume: Iscove's Modified Dulbecco Medium with L-Glutamine and Phenol Red (IMDM) (Gibco) 45,5%; Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose (DMEM) (Gibco) 45,5%; Soro Fetal Bovino (10270-106, Gibco), inativado a 56 °C por 30 minutos, 5%; Solução aquosa 10% (m/v) de Pluronic F-68 (Sigma) 2%; Solução aquosa 4 mM de L-glutamina (Sigma) 2%. O meio de cultura preparado foi esterilizado por filtração em membranas 0,22 μm (Millipore).

4.2.2 Banco de células e preparo do inóculo

Um criotubo contendo 1 mL de suspensão de células BHK-21 (1×10^6 céls mL^{-1}) foi descongelado e adicionado a 30 mL de meio de cultura em um *T-flask* de 75 cm^2 (T75). Após 4 dias, a suspensão celular foi transferida para frascos T25 com 10 mL de meio de cultura, com concentração celular inicial de $0,12 \times 10^6$ céls mL^{-1} . Após 3 dias, a suspensão celular de cada um dos frascos de 25 cm^2 foi transferida para um T75 com 30 mL de meio de cultura e concentração celular de $0,12 \times 10^6$ céls mL^{-1} . O banco de trabalho foi gerado a partir de culturas em frascos *spinner* (Bellco Glass Inc., New Jersey, EUA), com impelidor magnético e 100 mL, com 50 mL de volume de trabalho; a rotação foi mantida em 30 rpm em base magnética (Sci-Era Quad Drive stirrer system, Bellco). Os frascos *spinner* foram

inoculados com concentração celular de $0,25 \times 10^6$ céls mL⁻¹ da suspensão dos frascos T75 em fase exponencial de crescimento. Após 3 dias de cultivo nos frascos *spinner*, foram transferidos 45% (v/v) da suspensão de células, 45% (v/v) de meio de cultura e 10% (v/v) de DMSO para um criotubo de 2 mL com concentração celular final de 2×10^6 céls mL⁻¹. Os procedimentos descritos neste item foram realizados em incubadora (modelo Forma 3110, Thermo Fisher Scientific Inc., Ohio, EUA) a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂.

Os criotubos foram resfriados a -20 °C por 1 dia, transferidos para freezer a -80 °C por outras 24 h e foram, posteriormente, preservados em nitrogênio líquido.

Para o preparo do inóculo, um criotubo do banco de trabalho contendo 2 mL de suspensão celular foi descongelado e o procedimento seguiu como descrito acima até a inoculação do *spinner*. Após 72 horas de cultivo do *spinner*, o biorreator foi inoculado com concentração celular de $0,25 \times 10^6$ céls mL⁻¹.

4.3 CULTIVOS EM FRASCO SCHOTT

Os cultivos em frascos agitados foram conduzidos utilizando a célula S2AcGPV e meio SF 900 II suplementado com aminoácidos. Foram realizados dois experimentos, denominados “Aminoácidos” e “Cisteína”, descritos nos itens a seguir.

4.3.1 Teste com diferentes concentrações de aminoácidos

Para o primeiro teste, denominado “Aminoácidos”, o meio de cultura SF 900 II foi suplementado com os aminoácidos asparagina, cisteína, prolina e serina. Nesse teste, as concentrações dos aminoácidos de interesse foram duplicadas em relação a concentração destes no meio de cultura (Tabela 4.3). Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Tabela 4.3 – Concentração dos aminoácidos no meio de cultura suplementado para o teste “Aminoácidos” em frascos *Schott*

Ensaio	Concentração (g L ⁻¹)			
	Asparagina	Cisteína	Prolina	Serina
N	1,060	0,131	0,767	0,661
A	2,120	0,131	0,767	0,661
C	1,060	0,262	0,767	0,661
P	1,060	0,131	1,534	0,661
S	1,060	0,131	0,767	1,322
T	2,120	0,262	1,534	1,322

Foram preparados inicialmente 80 mL dos diferentes meios de cultura, adicionando um volume suficiente de cada solução estoque de aminoácidos estéril ao meio sem suplementação, de modo que a concentração do aminoácido de interesse fosse o dobro daquela encontrada no meio de cultura. Os meios de cultura suplementados foram estocados em frascos *Schott* a 4 °C até o momento da utilização.

O inóculo foi transferido para um dos três frascos da triplicata da condição, contendo 60 mL de volume e concentração celular de 5×10^5 céls mL⁻¹. Após homogeneização manual, o volume foi dividido entre outros dois frascos, totalizando 20 mL de cultura em cada um dos três frascos. O procedimento foi repetido para todas as condições de suplementação estudadas.

Foram coletadas amostras de cada um dos frascos em intervalos de aproximadamente 24 horas, para a determinação da concentração celular e posterior análise e quantificação de componentes no meio de cultura.

4.3.2 Teste com diferentes concentrações de Cisteína

No segundo teste, denominado “Cisteína” (Tabela 4.4), foram testadas diferentes concentrações de cisteína, incluindo a repetição do ensaio de concentração duplicada. As amostras de cada frasco foram coletadas em intervalos

de 24 horas para a determinação da concentração celular e posterior análise e quantificação de componentes no meio de cultura. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Tabela 4.4 – Concentração dos aminoácidos no meio de cultura suplementado para o teste “Cisteína” em frascos *Schott*

Ensaio	Concentração (g L ⁻¹)			
	Asparagina	Cisteína	Prolina	Serina
C-1,5X	1,060	0,196	0,767	0,661
C-2X	1,060	0,262	0,767	0,661
C-3X	1,060	0,393	0,767	0,661
C-5X	1,060	0,655	0,767	0,661

4.4 CULTIVOS EM BIORREATOR

Os ensaios foram conduzidos em biorreator (modelo Biostat B, Sartorius AG, Goettingen, Alemanha), equipado com controladores de temperatura, pH, frequência de agitação e oxigênio dissolvido. Esses controles se comunicam através de um sistema Compact Field Point (National Instruments, Austin, EUA) com um microcomputador equipado com *software* desenvolvido em linguagem LabVIEW (National Instruments), capaz de armazenar e apresentar graficamente os dados referentes às variáveis do cultivo.

Foi utilizada uma dorna de 2 L de volume total e 1,5 L de volume de trabalho, impelidor do tipo *pitched blade* com 2 lâminas e 45° de inclinação e tubo de aeração com aspersor em forma de anel. Os sistemas de retenção celular adotados foram o *spin-filter* interno (BB-8808325, Sartorius), de aço inoxidável e diâmetro do poro de 75 µm nos cultivos com S2AcGPV, e o *spin-filter* interno (BB-8808571, Sartorius), descartável de poliéster e diâmetro de poro de 10 µm nos cultivos com BHK-21 (C13) (Figura 4.1). Ambos foram acoplados ao eixo de rotação do impelidor.

Figura 4.1 – *Spin-filter* interno de aço inoxidável e *mesh* de 75 μm (A) e *spin-filter* interno de poliéster e *mesh* de 10 μm (B).

O sistema composto por biorreator, *spin-filter*, eletrodos, sensores e frascos de meio de cultura foram autoclavados a 121 °C por 30 minutos e está representado de forma simplificada na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Esquema do processo em perfusão com *spin-filter* interno

A transferência de oxigênio para o meio de cultura foi realizada por borbulhamento de mistura composta por ar, oxigênio e/ou nitrogênio. O controle de oxigênio dissolvido foi realizado pelo equipamento. Após a inoculação, a concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo foi controlada em 30% e 50%

da saturação com o ar nos cultivos de S2AcGPV e de BHK-21, respectivamente. A vazão da mistura de gases na entrada do biorreator foi controlada por fluxômetro (modelo 5850E, Brooks Instrument, Hatfield, EUA) em 120 mL min^{-1} nos cultivos de células S2AcGPV e 200 mL min^{-1} nos cultivos de células BHK-21.

O pH dos cultivos de BHK-21 foi controlado em 7,2, através da adição de solução de NaHCO_3 (8% m/v), e apenas monitorado nos cultivos de S2AcGPV.

Para a realização do processo contínuo, foram utilizadas bombas peristálticas (modelo 101U, Watson Marlow, Wilmington, EUA). Nos cultivos de células S2AcGPV a vazão foi controlada em 750 mL dia^{-1} , correspondente a uma taxa de diluição de $0,5 \text{ dia}^{-1}$.

Nos cultivos de células BHK-21 a vazão foi controlada em 1200 mL dia^{-1} , correspondente a uma taxa de diluição de $0,8 \text{ dia}^{-1}$. O volume do reator foi mantido constante por tubo coletor posicionado na marca de 1,5 L. No cultivo contínuo de células BHK-21 foi utilizado antiespumante (Antifoam C Emulsion, Sigma), solução aquosa 10% (v/v), adicionado diretamente no interior do biorreator a uma vazão estimada em $0,1 \text{ mL h}^{-1}$.

Os cultivos em biorreator foram realizados em 3 etapas a partir da inoculação. Os cultivos tem início como uma batelada e ainda na fase exponencial de crescimento celular, tem início a etapa de cultivo contínuo, a partir do acionamento das bombas de alimentação e retirada de meio de cultura. A vazão das bombas é ajustada para que a taxa de diluição seja menor que a velocidade específica máxima de crescimento da célula utilizada. O cultivo em quimiostato é caracterizado pela tendência em se chegar a um estado estacionário, no qual as concentrações de nutrientes, metabólitos e células no interior do biorreator permanecem constantes. A partir do momento em que o cultivo apresenta um estado estacionário, tem início o cultivo em perfusão, caracterizado pela retenção de células no interior do biorreator.

A retirada de meio do biorreator foi realizada ora por tubo coletor posicionado externamente ao *spin-filter*, de forma a coletar meio não filtrado pelo *spin-filter* e ora por outro tubo coletor posicionado no interior do filtro. Este *set-up* permitiu a realização da etapa de cultivo contínuo sem retenção de células intermediária entre a batelada e a perfusão, sem interrupção.

As amostras dos cultivos em biorreator foram coletadas em intervalos de

aproximadamente 12 horas, para determinação de concentração celular e análise da concentração de metabólitos e componentes no meio de cultura.

O cultivo foi considerado em estado estacionário quando o coeficiente de variação (**CV**) (Equação 4.1) da concentração celular, de glicose e de lactato fosse inferior a 10% por pelo menos dois tempos de residência – razão entre o volume de trabalho do biorreator (L) e a vazão de alimentação (L dia⁻¹).

$$CV = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

De cada amostra coletada (800 μ L dos cultivos em frasco *Schott* e 10 mL dos cultivos em biorreator), retirou-se uma alíquota de 90 μ L para determinação da concentração celular e o restante da amostra foi centrifugado a 3000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22 μ m (Millipore) e estocado em microtubos a -20 °C para análise de aminoácidos, glicose, lactato, glutamato e glutamina. Das amostras dos cultivos de células S2AcGPV, a concentração celular foi determinada e uma alíquota contendo 10⁶ céls mL⁻¹ foi retirada para quantificação de GPV. A metodologia utilizada para determinação da concentração celular, substratos, metabólitos e produto é descrita nos itens a seguir.

4.5.1 Concentração e Viabilidade Celular

A determinação da concentração e viabilidade celular foi realizada por contagem de células totais e inviáveis em hemacitômetro. A 90 μ L de amostra do cultivo foram adicionados 10 μ L de Azul de Tripán (Trypan Blue Solution 0,4%, Cell Culture Tested, Sigma), seguido de homogeneização. A amostra foi, em seguida, cuidadosamente depositada entre um hemacitômetro espelhado (Neubauer

improved) e uma lamínula (FRESHNEY, 2005). Foram contados, em microscópio óptico, 8 quadrantes do hemacitômetro contendo de 20 a 50 células cada um. Caso o coeficiente de variação ou a diferença entre as somas de cada conjunto de 4 quadrantes fosse maior que 20%, mais 4 quadrantes eram contados. As amostras mais concentradas eram diluídas utilizando-se tampão PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2mM, Na₂HPO₄ 8mM e KH₂PO₄ 15mM) (Sigma), de maneira a manter o número de células de 20 a 50 por quadrante. O volume de amostra do cultivo a ser diluída foi padronizado em 30 μ L e o volume de Azul de Tripán sempre suficiente para que estivesse numa concentração de 0,04%.

A viabilidade celular foi determinada através da contagem de células totais e não viáveis. As células não viáveis, em função de falhas na membrana, absorvem o Azul de Tripán e tornam-se visivelmente azuladas quando observadas ao microscópio (BUTLER, 2004).

4.5.2 Concentração de Glicose e de Lactato

A quantificação de glicose e de lactato foi realizada em HPLC (Waters, Milford, EUA) utilizando coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H, Bio-Rad, Hercules, EUA) a 60 °C. A concentração de glicose foi determinada com o auxílio de detector de índice de refração (modelo 2414, Waters) a 50 °C e a concentração de lactato foi determinada utilizando detector UV/Vis (modelo 2489, Waters) a 214 nm. Como fase móvel, foi utilizada solução de H₂SO₄ 5 mM a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹.

4.5.3 Concentração de Glutamina e de Glutamato

As quantificações de glutamina e glutamato foram realizadas simultaneamente no analisador bioquímico (modelo YSI 2700 Select Dual Channel, YSI Incorporated, Yellow Springs, EUA). Neste sistema há dois eletrodos sensíveis a

peróxido de hidrogênio, cada um em contato com uma membrana contendo uma ou mais enzimas imobilizadas. O peróxido de hidrogênio é oxidado no ânodo do eletrodo, gerando um sinal amperométrico proporcional à concentração da espécie que está sendo quantificada.

Para a quantificação de glutamato foi utilizada uma membrana com a enzima glutamato oxidase imobilizada, que catalisa a oxidação de glutamato a α -cetoglutarato liberando uma molécula de H_2O_2 .

Para a determinação de glutamina foi utilizada uma membrana com as enzimas glutaminase e glutamato oxidase imobilizadas, que catalisam as reações de formação de glutamato a partir da glutamina e de oxidação de glutamato a α -cetoglutarato respectivamente, liberando uma molécula de H_2O_2 . Esta segunda reação, porém, utiliza como substrato tanto o glutamato proveniente da conversão de glutamina quanto o “glutamato livre” presente na amostra, quantificando portanto “glutamato total”. A concentração de glutamina é dada então pela diferença entre as concentrações de glutamato total (eletrodo de glutamina) e de glutamato livre (eletrodo de glutamato).

4.5.4 Concentração de Amônio

A quantificação de amônio foi realizada utilizando kit enzimático (R-Biopharm Aktiengesellschaft, Darmstadt, Alemanha). Na presença da enzima glutamato desidrogenase e de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), amônio reage com α -cetoglutarato formando L-glutamato e oxidando uma molécula de NADH a NAD^+ . A concentração de NADH pode ser monitorada por absorção em 340 nm e a diferença entre a concentração inicial e a concentração final é proporcional à concentração de amônio na amostra. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços (TPP) analisadas em leitor (modelo μ Quant, BioTek Instruments, Inc., Vermont, EUA).

4.5.5 Concentração de GPV

A concentração de GPV é representada pela quantidade de GPV por célula em determinado instante do cultivo, denominada GPVe (GPV específica).

A alíquota contendo 10^6 células foi centrifugada a 3000 rpm durante 3 minutos. Após descartar o sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em solução tampão de armazenamento T4, composta por 25 mM de TRIZMA® base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Sigma), 25 mM NaCl (Sigma), 5 mM $MgCl_2$ (Sigma), 1 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma), em solução 20% (v/v) Glicerol (Sigma) em água, com pH igual a 7,4 e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A concentração de glicoproteína do vírus rábico foi determinada através dos valores de densidade óptica do teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Institut Pasteur, Paris, França) conforme descrito por Astray *et al.* (2008). O procedimento foi realizado no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan.

4.6 TRATAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

4.6.1 Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica de crescimento pode ser definida pela Equação 4.2:

$$\mu = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{dX_V}{dt} \quad (4.2)$$

onde X_V é a concentração de células viáveis (céls/mL) e t é o tempo de cultivo (dias). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{MÁX}$) foi calculada a partir do coeficiente angular do trecho retilíneo existente na curva de $\ln(X_V) = f(t)$ (HISS,

2001). Neste trecho a derivada é constante e máxima. Quando necessário, o valor de μ_{MAX} calculado em uma dada condição onde há dados em triplicata, é resultado da média entre os três valores obtidos para cada uma das triplicatas.

4.6.2 Cálculo dos fatores de conversão

Nos cultivos em batelada ou na fase batelada de um cultivo contínuo, o fator de conversão substrato à célula da fase exponencial (Y_{XS}^{EXP}) pode ser calculado admitindo-se o intervalo de tempo da fase exponencial. Dessa forma, os Y_{XS}^{EXP} foram calculados através da regressão linear dos dados experimentais obtidos no intervalo de tempo da fase exponencial do experimento.

Para um mesmo cultivo, o fator de conversão global de substrato à célula (Y_{XS}^{global}) pode ser calculado admitindo-se o intervalo de tempo entre a inoculação e a concentração celular máxima obtida num cultivo em batelada ou na fase batelada de um cultivo contínuo. O Y_{XS}^{global} foi calculado a partir da Equação 4.3:

$$Y_{X/S} = \frac{X_V(t_2) - X_V(t_1)}{S(t_1) - S(t_2)} \quad (4.3)$$

De maneira análoga, podem ser calculados os fatores de conversão substrato à célula nos estados estacionários do cultivo em quimiostato e perfusão através das Equações 4.4 e 4.5 respectivamente:

$$Y_{X/S} = \frac{X_V(t)}{S_f - S(t)} \quad (4.4)$$

$$Y_{X/S} = \frac{hX_V(t)}{S_f - S(t)} \quad (4.5)$$

onde o termo S_f é a concentração de substrato no meio de cultura alimentado. Neste trabalho, os fatores de conversão apresentados para os estados estacionários são a

média dos cálculos realizados ponto a ponto durante o intervalo de tempo em que se considerou o cultivo no estado estacionário.

Da mesma maneira, pode-se calcular outros fatores de conversão (HISS, 2001), como a relação metabólito/célula (lactato, amônio) ($Y_{P/X}$) e o fator de conversão substrato a metabólito para os pares lactato/glicose e amônio/glutamina ($Y_{P/S}$).

4.6.3 Cálculo das velocidade específicas de consumo de substratos e de produção de metabólitos

As velocidades específicas de consumo de nutrientes (q_s) e produção de metabólitos (q_p) foram calculadas a partir das Equações 4.6 e 4.7 (NIELSEN, 2001), desprezando o coeficiente de manutenção celular:

$$q_s = \mu / Y_{X/S} \quad (4.6)$$

$$q_p = Y_{P/X} \cdot \mu \quad (4.7)$$

Para os cálculos de q_s e q_p nos estados estacionários, o fator de conversão utilizado é aquele calculado conforme descrito anteriormente, resultado da média dos fatores de conversão calculados ponto a ponto no estado estacionário.

4.6.4 Cálculo do fator de eficiência do sistema de retenção

A eficiência do sistema de retenção celular utilizado (h) foi calculada a partir da Equação 4.8:

$$h = X_V^{sf} / X_V \quad (4.8)$$

onde X_v^{sf} é a concentração de células viáveis retirada do biorreator pelo interior do *spin-filter* (não-retida) e X_v é a concentração de células viáveis no interior do biorreator.

Durante o estado estacionário do cultivo em perfusão, duas amostras do interior do *spin-filter* foram coletadas. A eficiência h foi calculada para os dois pontos e o valor adotado é resultado da média entre os dois valores calculados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para o tratamento estatístico dos dados relativos aos testes “Aminoácidos” e “Cisteína”, foi utilizado o *software* Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp., Fairfax, EUA).

Parâmetros como velocidade específica máxima de crescimento e fatores de conversão foram comparados através do *one-way Analysis of Variance* (ANOVA), com nível de significância $\alpha = 5\%$. No caso de existir uma diferença estatística entre os dados, ou seja, a dispersão causada pelos níveis ou tratamentos ser maior que a dispersão causada por ruído ou erros experimentais, foi utilizado um teste para determinar quais níveis ou tratamentos diferem entre si. O teste de Tukey HSD (*Tukey honest significant difference*) é aquele que fornece os resultados mais confiáveis (COMPTON, 2011) e o escolhido para a análise das diferenças entre as médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em processos de cultivo de células animais, a alta produtividade é, em geral, associada a altas concentrações celulares.

Em trabalho anterior, células de *Drosophila melanogaster* S2AcGPV foram cultivadas em quimiostato, o que possibilitou o estudo de sua fisiologia e da produção da glicoproteína (VIEIRA, 2010). Uma possibilidade para a obtenção de concentrações celulares maiores que aquelas obtidas em quimiostato, é a realização de cultivos em perfusão. Dessa maneira, espera-se que a produção da proteína de interesse seja mais alta que a obtida em quimiostato. Uma segunda possibilidade que permitiria o cultivo das mesmas células em concentrações mais altas é a suplementação do meio de cultura com o nutriente limitante dos cultivos em quimiostato.

Células de rim de *hamster* neonato (BHK-21) são utilizadas industrialmente como plataforma de expressão de proteínas heterólogas (BÖDECKER *et al.*, 1994; CASTILHO; MEDRONHO, 2002). O cultivo das células BHK-21 em processo de perfusão permite a contínua produção da proteína de interesse em alta concentração celular, aumentando a produtividade e a qualidade da proteína produzida, em comparação a outras estratégias de cultivo.

Dessa forma, neste trabalho foram realizados cultivos de células S2AcGPV em biorreator e em frascos agitados e cultivos de células BHK-21 em biorreator a fim de se obterem altas concentrações celulares.

5.1 ENSAIOS EM BIORREATOR COM CÉLULAS S2

Três ensaios em biorreator foram conduzidos utilizando células S2AcGPV e *spin-filter* interno como sistema de retenção celular. O *setup* experimental, com exceção do *spin-filter* e do volume de trabalho foi o mesmo utilizado por Vieira

(2010) que, cultivando células S2AcGPV em quimiostato, alcançou concentração celular máxima no estado estacionário de cerca de 27×10^6 céls mL⁻¹.

5.1.1 Cultivo S2Ac-1

O primeiro cultivo realizado atingiu uma concentração celular de $26,8 \times 10^6$ céls mL⁻¹, aproximadamente 5 dias após a inoculação (Figura 5.1). A concentração de glicose residual nesse instante era de 5,6 g L⁻¹ e a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{MÁX}$), calculada entre os instantes 1 e 3,5 dias, foi de 0,93 dia⁻¹. Vieira (2010) observou velocidades específicas máximas de crescimento entre 0,79 e 1,22 dia⁻¹ e concentrações de glicose residual, nos estados estacionários dos quimiostatos, entre 5,0 e 5,2 g L⁻¹. As bombas de alimentação e de retirada de meio de cultura foram acionadas no dia 5 do cultivo e a vazão foi ajustada para 0,75 L dia⁻¹, correspondente a uma taxa de diluição de 0,5 dia⁻¹, a mesma condição experimental dos cultivos realizados anteriormente pelo grupo.

Figura 5.1 – Perfil de crescimento celular (♦) e concentração de glicose (Δ) no cultivo S2Ac-1. As linhas pontilhadas indicam o acionamento e o desligamento das bombas de alimentação e retirada de meio de cultura do biorreator.

A concentração celular, que havia alcançado $26,8 \times 10^6$ céls mL⁻¹, havia diminuído até 9×10^6 céls mL⁻¹ após cerca de 40 horas do início do cultivo em modo contínuo. Uma possibilidade para o decréscimo da velocidade específica é a de que no momento em que as bombas foram acionadas já havia limitação nutricional, e as células cresciam em velocidade específica inferior à taxa de diluição imposta. As bombas foram então desligadas, porém após cerca de 14 horas o cultivo foi encerrado em decorrência de uma contaminação por microrganismos.

O fator de conversão glicose a célula na fase exponencial ($Y_{X/GLC}^{EXP}$) calculado foi de $7,8 \times 10^9$ céls g⁻¹, próximo daquele obtido por Vieira (2010) na fase exponencial de cultivos em batelada, de $8,0 \times 10^9$ céls g⁻¹.

5.1.2 Cultivo S2Ac-2

O Cultivo S2Ac-2 teve início utilizando a mesma linhagem celular e o mesmo *setup* experimental do Cultivo S2Ac-1. A velocidade específica máxima de crescimento celular calculada entre os tempos 1,5 e 5 dias foi de 0,77 dia⁻¹, 18% menor do que a alcançada no Cultivo S2Ac-1 e a concentração celular máxima alcançada na fase batelada após cerca de 5 dias de cultivo foi de $14,2 \times 10^6$ céls mL⁻¹, 46% inferior àquela obtida no Cultivo S2Ac-1. O cultivo S2Ac-2 foi encerrado no sétimo dia, após observação ao microscópio de que as células apresentavam sinais característicos de necrose, como aumento de volume citoplasmático e falhas na membrana causando extravasamento de material celular. Não é claro o motivo pelo qual o comportamento celular foi diferente nos dois cultivos. Sabe-se, no entanto, que células de inseto são muito sensíveis à tensão de cisalhamento, e que a presença do *spin-filter* influencia o comportamento hidrodinâmico no interior do biorreator. A tensão de cisalhamento a que as células foram submetidas pode ter provocado a perda de viabilidade celular por necrose uma vez que o limite de resistência das mesmas tenha sido ultrapassado (COTTER; AL-RUBEAI, 1995).

Yokomizo (2007) observou que a célula S2AcGPV atinge concentração celular máxima 42% inferior e velocidade específica máxima de crescimento 35% inferior em comparação com a linhagem S2 selvagem. Em função do ocorrido no Cultivo S2Ac-1 e no Cultivo S2Ac-2, uma terceira tentativa foi realizada, utilizando a linhagem S2 selvagem.

5.1.3 Cultivo S2s-3

O *setup* experimental do Cultivo S2s-3 permaneceu inalterado com relação aos outros dois cultivos.

A velocidade específica máxima de crescimento celular calculada entre os tempos 3 e 5,5 dias foi de $0,95 \text{ dia}^{-1}$, muito próxima daquela obtida no Cultivo S2Ac-1. Porém, o Cultivo S2s-3 apresentou uma fase lag de aproximadamente 2 dias não observada nos cultivos com células S2AcGPV, provavelmente devido ao fato de as células S2 selvagens não estarem adaptadas ao cultivo em biorreator, sendo mantidas por sucessivas gerações em garrafas T25 antes do preparo dos estoques.

A concentração celular máxima, $14,7 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$, foi alcançada em aproximadamente 6 dias de cultivo, muito próxima daquela obtida no Cultivo S2Ac-2. Pamboukian (2008), que cultivou células S2 selvagens em biorreator em batelada utilizando o mesmo meio de cultura SF 900 II, observou um $\mu_{\text{MÁX}}$ igual a $1,07 \text{ dia}^{-1}$, próximo do obtido no cultivo S2s-3. No entanto, a concentração celular máxima obtida nesse cultivo foi de $51,2 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$. O Cultivo S2s-3 foi encerrado ainda no sexto dia de cultivo pelo mesmo motivo observado no Cultivo S2Ac-2.

Seriam necessários estudos mais aprofundados a fim de se avaliar o quão maior é a tensão de cisalhamento a que as células utilizadas neste trabalho foram submetidas em função da presença do *spin-filter* e se esta seria suficiente para desencadear o mecanismo de necrose celular. Contudo, pelo fato de os cultivos terem sido conduzidos nas mesmas condições em que foram conduzidos

anteriormente com sucesso, à exceção do *spin-filter*, provavelmente seja este o motivo que levou ao término prematuro dos cultivos S2Ac-2 e S2s-3.

Em função das dificuldades enfrentadas no estabelecimento de uma metodologia de cultivo em perfusão para as células S2, os ensaios em frascos *Schott* com meio de cultura suplementado foram então realizados com o intuito de investigar o nutriente limitante do cultivo dessas células em meio SF 900 II e, desse modo, alcançar concentrações celulares mais altas do que aquelas obtidas até o momento.

5.2 ENSAIOS EM FRASCOS SCHOTT COM CÉLULAS S2

Os ensaios em frascos agitados (frascos *Schott*) foram realizados a fim de se determinar o nutriente limitante dos cultivos da célula S2AcGPV em meio SF 900 II. Vieira (2010) realizou ensaios com diferentes concentrações de glutamina adicionada, concluindo que a quantidade do aminoácido no meio de cultura SF 900 II não é limitante para o crescimento celular – a mesma observação feita por Pamboukian (2007). A concentração de glicose residual em seus ensaios (entre 3 e 4 g L⁻¹) sugere que a glicose também não é limitante para o crescimento de células S2 naquele meio. Vieira (2010) constatou ainda que os aminoácidos mais consumidos durante o cultivo das S2AcGPV eram asparagina, cisteína, prolina e serina os quais foram considerados candidatos a nutriente limitante neste trabalho.

Todos os ensaios em frascos *Schott* apresentados foram realizados em triplicata. Os cultivos foram interrompidos quando a concentração celular apresentou uma queda de no mínimo 3×10^6 céls mL⁻¹ em comparação à concentração máxima observada ($\Delta X_V = 3 \times 10^6$ céls mL⁻¹), ou quando a viabilidade celular era inferior a 70%. As considerações e principais análises dos dados dos ensaios foram feitas durante a fase exponencial de crescimento. Por se tratar de uma população celular, o perfil das cinéticas de crescimento das células S2AcGPV após a fase exponencial e em estágio de declínio apresentou variação entre as triplicatas de um mesmo teste. Nesse momento, devido ao esgotamento de algum nutriente, houve uma

diminuição da viabilidade celular, dificultando o processo de contagem em hemacitômetro. Este fenômeno não ocorreu no período entre o momento da inoculação e o final da fase exponencial de crescimento, tornando este intervalo um bom conjunto de dados a ser analisado.

5.2.1 Teste com diferentes concentrações de aminoácidos

O teste com diferentes concentrações de aminoácidos foi realizado em meio de cultura SF 900 II suplementado com as soluções concentradas estéreis de asparagina (Asn), prolina (Pro), cisteína (Cys) e/ou serina (Ser), de modo que a concentração dos aminoácidos fosse o dobro da sua concentração no meio de cultura original (Tabela 4.1).

As condições testadas foram: N (controle, não suplementado); A (meio de cultura suplementado com asparagina); C (suplementado com cisteína); P (suplementado com prolina); S (suplementado com serina); T (suplementado com os quatro aminoácidos citados anteriormente). A concentração dos aminoácidos nas diferentes condições é apresentada na Tabela 4.3.

Os perfis de crescimento celular e de consumo de glicose e glutamina são apresentados na Figura 5.2.

A condição com meio de cultura suplementado com os quatro aminoácidos foi aquela que apresentou a maior concentração celular máxima, seguido da condição suplementada com cisteína, não sendo estatisticamente diferentes entre si (Figuras 5.3 e 5.4). A concentração celular máxima é estatisticamente diferente entre a condição suplementada com os quatro aminoácidos e as condições com suplementação de asparagina, prolina e serina e entre a condição com suplementação de cisteína e a suplementada com prolina. Os dados das médias de X_v e dos outros parâmetros foram comparados por ANOVA e, existindo diferenças significativas foi realizado o teste de Tukey HSD para a determinação de quais médias diferem entre si conforme descrito no item 4.8.

Figura 5.2 – Perfis de crescimento celular ($\blacklozenge$), concentração de glicose ($\blacktriangle$) e glutamina ($\circ$) no teste em frasco *Schott* com diferentes concentrações iniciais de aminoácidos. (a) **A** – $2,12 \text{ g L}^{-1}$ de Asn; (b) **C** – $0,26 \text{ g L}^{-1}$ de Cys; (c) **P** – $1,53 \text{ g L}^{-1}$ de Pro; (d) **S** – $1,32 \text{ g L}^{-1}$ de Ser; (e) **T** – $2,12 \text{ g L}^{-1}$ de Asn, $0,26 \text{ g L}^{-1}$ de Cys, $1,53 \text{ g L}^{-1}$ de Pro, $1,32 \text{ g L}^{-1}$ de Ser; (f) **N** – SF 900 II sem suplementação. Os pontos representam as médias dos dados das triplicatas. As barras representam o erro padrão associado aos cálculos das médias.

Figura 5.3 – Concentração celular máxima (X_{VMAX}) e velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{MAX}) no teste com diferentes concentrações de aminoácidos. Teste **A** – 2,12 g L^{-1} de Asn; Teste **C** – 0,26 g L^{-1} de Cys; Teste **P** – 1,53 g L^{-1} de Pro; Teste **S** – 1,32 g L^{-1} de Ser; Teste **T** – suplementado com os quatro aminoácidos; Teste **N** – meio de cultura SF 900 II puro. As barras representam o erro padrão associado aos cálculos das médias.

Figura 5.4 – Comparação estatística das médias de concentração celular máxima (X_{VMAX}) para cada condição testada (A); e das médias das velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_{MAX}) para cada condição testada (B). As barras representam o intervalo de confiança de 95% do teste de Tukey HSD.

Rossi (2008) não observou diferença nas concentrações celulares máximas utilizando meio de cultura SF 900 II suplementado com 6,72 mg L^{-1} de cisteína em relação ao meio de cultura sem suplementação. Já Vieira (2010) observou que a adição de 131 mg L^{-1} de cisteína no meio SF 900 II, que já contém inicialmente 131 mg L^{-1} (Tabela 4.1) desse aminoácido, é capaz de promover um aumento da concentração celular, no estado estacionário de um cultivo em quimiostato, de 26,9 para $29,7 \times 10^6$ céls mL^{-1} , um incremento de 10,4%. Neste trabalho, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração celular

máxima entre as condições com alguma suplementação e a condição controle sem suplementação (Figura 5.4A).

A maior velocidade específica máxima de crescimento celular foi observada utilizando meio de cultura suplementado com cisteína, igual a $0,749 \text{ dia}^{-1}$, próxima da observada para a condição com suplementação dos quatro aminoácidos, igual a $0,683 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 5.3). Ambas são estatisticamente diferentes das velocidades específicas alcançadas tanto nas outras condições com meio suplementado quanto no controle (Figura 5.4). Vieira (2010) constatou células cultivadas em meio SF 900 II suplementado com prolina, serina e asparagina apresentaram velocidades específicas de crescimento inferiores às observadas no ensaio controle, fenômeno não observado neste trabalho.

A concentração de glicose residual (Figura 5.2) foi menor naquelas condições que alcançaram maior concentração celular máxima e que tiveram maiores velocidades específicas de crescimento (condições C e T). O fator de conversão glicose a célula na fase exponencial ($Y_{X/GLC}^{EXP}$) foi maior para essas mesmas condições (Figura 5.5), o que mostra um menor consumo de glicose para a produção do mesmo número de células em comparação com as outras condições testadas. Há diferença estatisticamente significativa nesse parâmetro entre a condição C e as demais condições testadas, com exceção da condição T.

Figura 5.5 – Fator de conversão glicose a célula ($Y_{X/GLC}^{EXP}$) no teste com diferentes concentrações de aminoácidos e comparação estatística para cada condição testada. No gráfico de fatores de conversão as barras representam o erro padrão associado aos cálculos das médias e no gráfico de médias as barras representam o intervalo de confiança de 95% do teste de Tukey HSD.

Utilizando dois meios de cultura, IPL-41 e EMICG, que diferem basicamente na concentração total de aminoácidos, Ferrance *et al.* (1993) observaram uma relação muito próxima entre o metabolismo para obtenção de energia e o processamento biossintético da célula. A suplementação do meio SF 900 II com cisteína aparentemente proporciona um melhor aproveitamento da glicose na geração de células, o que pode ser explicado pela importância do aminoácido no rendimento de proteína recombinante observado por Radford *et al.* (1997).

Células Sf9 são capazes de sintetizar cisteína a partir de metionina em estágios iniciais da cultura dessas células, através da via da β -cistationina (DOVERSKOG; HAN; HÄGGSTRÖM, 1998). Segundo os autores, a explicação provável para o fenômeno é a de que os genes que controlam a biossíntese de cisteína encontram-se ativados em células que se encontram na fase exponencial de crescimento e reprimidos na fase estacionária do crescimento. Na condição em que há presença de cisteína no meio de cultura, no entanto, a velocidade de consumo do aminoácido e as velocidades de consumo de glicose e glutamina foram maiores. Não foram encontrados na literatura dados referentes ao cultivo de células S2 em meio de cultura livre de cisteína.

O maior rendimento em células pode ainda ser devido a uma maior utilização de aminoácidos como fonte de energia, particularmente na condição T (suplementado com os quatro aminoácidos), no qual a oferta de aminoácidos é bem superior ($2,62 \text{ g L}^{-1}$ maior) do que a disponível no meio SF 900 II puro. Sabe-se que alguns dos aminoácidos suplementados, como asparagina e serina, podem ser utilizados para obtenção de energia (DREWS; PAALME; VILU, 1995). Doverskog, Han e Häggström (1998) observaram também que o consumo dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, leucina, valina e tirosina, geralmente associados ao metabolismo energético, aumenta na presença de cisteína. O fenômeno não foi observado nos ensaios com suplementação de asparagina, serina e prolina.

O aumento da velocidade específica de crescimento, observado nas condições onde cisteína foi suplementada ao meio de cultura (C e T) pode ter sido devido a uma mudança no metabolismo celular já que o transportador específico para cisteína é concentração-dependente (DOVERSKOG; HAN; HÄGGSTRÖM, 1998) e o aminoácido afeta o aporte de glicose e de outros aminoácidos. A hipótese

de a célula S2 adaptar o metabolismo em função da disponibilidade nutricional foi também observada por Moraes *et al.* (2011). Apesar de não existir diferença estatisticamente significativa, as duas condições suplementadas com cisteína (C e T) alcançam concentração celular ligeiramente mais alta do que as outras condições, indicando que a cisteína pode ser substrato limitante do cultivo de células S2ACGPV em meio de cultura SF 900 II. Dessa forma, foi realizado um segundo teste em frascos *Schott*, com diferentes concentrações de cisteína.

5.2.2 Teste com diferentes concentrações de cisteína

O teste com diferentes concentrações de cisteína foi realizado suplementando o meio de cultura SF 900 II com concentrações uma vez e meia maior (C-1,5x), duas vezes maior (C-2x), três vezes maior (C-3x) e cinco vezes maior (C-5x). A concentração final do aminoácido no meio de cultura, em cada condição, está descrita na Tabela 4.4.

Os perfis de crescimento celular e de consumo de glicose e glutamina são apresentados na Figura 5.6. A concentração celular máxima obtida nas diferentes condições deste teste foram muito semelhantes, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si (Figuras 5.7 e 5.8).

A condição em que cisteína foi quintuplicada (C-5x, Figura 5.6d) apresentou também uma fase *lag* não observada nas outras condições, o que não é usual, visto que as células utilizadas como inóculo ainda estavam em fase exponencial de crescimento. A concentração de células viáveis nessa condição 24 horas após a inoculação foi menor do que a concentração de células viáveis no instante zero. A concentração de células totais foi a mesma nas duas contagens (dados não mostrados). A viabilidade celular na amostra em questão foi próxima de 80%, enquanto que nas demais condições do teste foi próxima de 100%. As células submetidas à concentração 5x maior de cisteína alcançaram viabilidade próxima de 100% apenas no sétimo dia de cultivo (dados não mostrados).

Figura 5.6 – Perfis de crescimento celular ($\blacklozenge$), concentração de glicose ($\triangle$) e glutamina ($\circ$) no teste em frasco *Schott* com diferentes concentrações iniciais de cisteína. (a) **C-1,5x** – 0,196 g L⁻¹ de Cys; (b) **C-2x** – 0,262 g L⁻¹ de Cys; (c) **C-3x** – 0,393 g L⁻¹ de Cys; (d) **C-5x** – 0,655 g L⁻¹ de Cys. As barras representam o erro padrão associado ao cálculo da média.

Figura 5.7 – Concentração celular máxima (X_{vMAX}) e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{MAX}) no teste com diferentes concentrações iniciais de cisteína. As barras representam o erro padrão associado aos cálculos das médias.

Figura 5.8 – Comparação estatística das médias de concentração celular máxima (X_{VMAX}) para cada condição testada (A); e das médias das velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_{MAX}) para cada condição testada (B). As barras representam o intervalo de confiança de 95% do teste de Tukey HSD.

As células na condição C-2X alcançaram a maior velocidade específica máxima de crescimento (Figura 5.7), $0,842 \text{ dia}^{-1}$, mais alta do que a velocidade específica máxima observada na mesma condição, no teste anterior com diferentes concentrações de aminoácidos, $0,749 \text{ dia}^{-1}$. A velocidade específica máxima de crescimento celular nessa condição é estatisticamente diferente das observadas nas condições C-3X e C-5X (Figura 5.8). A reprodutibilidade do parâmetro entre os dois testes, apesar de se tratar exatamente da mesma condição e da mesma linhagem celular, é comprometida principalmente pelo fato de as células S2AcGPV não serem verdadeiros clones e sim uma população isolada, devido à dificuldade em crescer em baixíssimas concentrações (YOKOMIZO *et al.*, 2007). A existência de células com graus diferentes de expressão ou ainda que não expressam a proteína recombinante numa mesma população é uma fonte de variabilidade de resultados sobre a qual não se tem controle, podendo apenas ser minimizada.

Swiech (2007), utilizando células S2AcGPV mantidas em cultura durante quatro anos, notou uma acentuada diminuição da produção de GPV em relação àquela originalmente reportada por Yokomizo *et al.* (2007). O fato foi relacionado tanto com a possível perda do gene recombinante que codifica para a proteína de interesse, quanto pelo surgimento de subpopulações não produtoras da proteína, que possuem vantagens relacionadas ao crescimento celular se comparadas às células transformadas. As células utilizadas no experimento com diferentes concentrações de cisteína foram mantidas em repiques durante cerca de um mês

antes do início do teste, o que pode explicar a velocidade específica máxima mais alta que aquela obtida no experimento anterior.

A concentração de glicose residual (Figura 5.6) foi semelhante para todas as condições do teste, à exceção da condição C-5x, em que houve menor consumo do substrato. Os fatores de conversão glicose a célula na fase exponencial ($Y_{X/GLC}^{EXP}$) foram semelhantes, não existindo diferenças significativas entre eles (Figuras 5.9 e 5.10).

Figura 5.9 – Fator de conversão glicose a célula ($Y_{X/GLC}^{EXP}$) e GPV específica máxima ($GPVe_{MAX}$) produzida no teste com diferentes concentrações iniciais de cisteína. As barras representam o erro padrão associado aos cálculos das médias.

Figura 5.10 – Comparação estatística das médias dos fatores de conversão glicose a célula ($Y_{X/GLC}^{EXP}$) para cada condição testada (A); e das médias de GPV específica máxima ($GPVe_{MAX}$) para cada condição testada (B). As barras representam o intervalo de confiança de 95% do teste de Tukey HSD.

Não foi detectada a presença de lactato nos dois testes realizados, pois provavelmente o metabólito foi produzido em concentrações muito baixas. Células S2AcGPV produzem quantidades mínimas de lactato conforme observado por Vieira (2010) e Rossi (2008).

A produção de GPV, representada pelo valor de GPV específica máxima (GPV_{eMAX}) (Figura 5.9), foi maior na condição C-3x. No entanto, a análise estatística dos dados não revela diferença significativa entre as condições testadas (Figura 5.10), em função de uma baixa reprodutibilidade do ensaio ELISA, mesmo sendo realizado em duplicata. Swiech (2007) concluiu que cultivos em temperatura sub-fisiológica (22 °C), um fator de estresse para a célula, aumentam a produção específica de proteína recombinante e simultaneamente provocam uma diminuição na velocidade específica máxima de crescimento celular. O fato foi associado a um melhor aproveitamento nutricional por parte da célula direcionado para a síntese da glicoproteína. Uma hipótese para justificar a maior produção de GPV na condição C-3x é a de que a concentração elevada do aminoácido seja um fator de estresse para a célula, refletido na menor velocidade específica de crescimento e na maior produção específica de proteína. Além disso, a cisteína tem importante papel na estabilização de estruturas proteicas através da formação de pontes dissulfeto (FREEDMAN, 1984) – concentrações mais elevadas do aminoácido podem ter favorecido a manutenção da conformação de GPV e, conseqüentemente, seu reconhecimento pelo anticorpo utilizado no ensaio ELISA.

5.3 ENSAIOS EM BIORREATOR COM CÉLULAS BHK

Foram conduzidos dois ensaios em biorreator utilizando a célula BHK-21 adaptada ao crescimento em suspensão. O primeiro cultivo, em batelada, foi útil para a obtenção de parâmetros fisiológicos como a velocidade específica máxima de crescimento celular, fatores de conversão substrato à célula e velocidades específicas de produção de metabólitos. Os parâmetros calculados para esse cultivo puderam ser comparados com aqueles obtidos em outros cultivos em batelada,

realizados pelo grupo em outros modelos de biorreator (FERNÁNDEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2012), e foram úteis para o planejamento do cultivo em perfusão.

5.3.1 Cultivo em batelada BHK-B

O cultivo em batelada utilizando células BHK-21, denominado BHK-B foi realizado em biorreator com volume de trabalho de 1 L, sem a presença do *spin-filter*. Os perfis de crescimento celular, consumo de substratos e produção de metabólitos deste cultivo são apresentados nas Figuras 5.11 e 5.12.

Após a inoculação, o cultivo apresentou uma fase lag de aproximadamente 17 horas. A fase de crescimento exponencial durou cerca de 33 horas e a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{MÁX}}$) foi $1,37 \text{ dia}^{-1}$. Em cultivos realizados anteriormente pelo grupo, utilizando reator modelo Bioflo 110 (New Brunswick Scientific, Enfield, EUA) nas mesmas condições deste experimento, a velocidade específica máxima observada foi de $1,55 \text{ dia}^{-1}$ (FERNÁNDEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2012).

Figura 5.11 – Perfis de crescimento celular (◆), concentração de glicose (Δ) e lactato (▲) no cultivo em batelada com células BHK-21.

Figura 5.12 – Perfis de crescimento celular (◆), concentração de glutamina (○), amônio (■) e glutamato (●) no cultivo em batelada com células BHK-21.

A concentração celular máxima alcançada neste cultivo foi de $5,3 \times 10^6$ céls mL^{-1} , cerca de 21% mais alta do que a registrada por Fernández-Núñez *et al.* (2012) e mais alta também do que as reportadas por Cruz *et al.* (2002) ($0,6\text{--}1,8 \times 10^6$ céls mL^{-1}) e por Moreira *et al.* (1995) ($1,5\text{--}2,0 \times 10^6$ céls mL^{-1}) em diferentes meios de cultura com e sem soro em sua composição.

As concentrações de lactato e de amônio no final da fase exponencial foram $3,1 \text{ g L}^{-1}$ (35,4 mM) e 2,4 mM, respectivamente. De acordo com Gódia e Cairó (2006), é necessária uma concentração de lactato de 40 mM para que o metabólito cause efeitos visíveis no crescimento celular. Quanto ao amônio, concentrações de 2 a 4 mM são suficientes para alterar o metabolismo de células animais e, conseqüentemente, afetar seu crescimento. No entanto, a diminuição da velocidade específica de crescimento celular foi acompanhada também pelo esgotamento de glutamina, de modo que o cultivo pode ter saído da fase exponencial tanto por inibição por amônio quanto pelo esgotamento do aminoácido.

De fato, a relação entre o completo esgotamento de glutamina e o final da fase exponencial sugere que glutamina pode ser limitante do crescimento celular no processo em batelada. No entanto, a suplementação do aminoácido no meio de cultura não é uma estratégia viável para a obtenção de concentrações celulares mais altas, já que o aumento na concentração de glutamina poderia interferir no

transporte de outros aminoácidos além de levar à uma maior produção de amônio, podendo inibir o crescimento celular ainda mais cedo (BUTLER; JENKINS, 1989). Neste caso o cultivo em batelada alimentada, no qual é possível o controle da oferta nutricional, seria recomendado e provavelmente produziria melhores resultados.

A completa oxidação de glutamina pela via da glutamato desidrogenase (GDH) produz dois mols de amônio para cada mol de glutamina metabolizada. Os valores do fator de conversão glutamina a amônio ($Y_{NH4/GLN}$ – Tabela 5.1) foram muito abaixo desse valor, indicando que, na condição do cultivo, glutamina foi metabolizada majoritariamente através de outras vias.

Tabela 5.1 – Comparação dos parâmetros fisiológicos calculados nos cultivos BHK-B, BHK-P e em cultivo realizado anteriormente pelo grupo com células BHK-21

Parâmetros	BHK-B		BHK-P ^a		Fernández-Nuñez et al. (2012)	
<i>Fase</i>	Batelada		Batelada		Batelada	
<i>Spin-filter?</i>	Não		Sim		Não	
$\mu_{MÁX}$ (dia ⁻¹)	1,37		1,47		1,55	
$X_{V,MÁX}$ (10 ⁶ céls mL ⁻¹)	5,3		2,9		4,3	
Intervalo	Exp.	Global	Exp.	Global	Exp.	Global
$Y_{X/GLC}$ (10 ⁹ céls mmol ⁻¹)	0,32	0,30	0,19	0,16	0,33	0,31
$Y_{X/GLN}$ (10 ⁹ céls mmol ⁻¹)	1,14	1,78	0,95	0,83	0,99	1,27
$Y_{LAC/X}$ (mmol (10 ⁹ céls) ⁻¹)	7,35	7,38	12,01	15,11	4,18	4,13
$Y_{NH4/X}$ (mmol (10 ⁹ céls) ⁻¹)	0,46	0,36	0,78	0,92	0,44	0,44
$Y_{LAC/GLC}$ (mol mol ⁻¹)	2,33	2,23	2,25	2,49	1,40	1,28
$Y_{NH4/GLN}$ (mol mol ⁻¹)	0,52	0,64	0,75	0,77	0,42	0,58
q_{GLC} (mmol (10 ⁹ céls) ⁻¹ dia ⁻¹)	4,33	-	7,88	-	4,65	-
q_{GLN} (mmol (10 ⁹ céls) ⁻¹ dia ⁻¹)	1,20	-	1,55	-	1,56	-
q_{LAC} (mmol (10 ⁹ céls) ⁻¹ dia ⁻¹)	10,07	-	17,72	-	6,47	-
q_{NH4} (mmol (10 ⁹ céls) ⁻¹ dia ⁻¹)	0,62	-	1,15	-	0,69	-

^a O cultivo BHK-P está descrito no item 5.3.2. As informações nesta tabela correspondem à etapa descontínua do cultivo.

Os fatores de conversão glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$ – Tabela 5.1) atingiram valores superiores a 2, que é o valor máximo para a conversão estequiométrica de glicose a lactato, resultado não observado por Fernández-Núñez *et al.* (2012). No entanto, a contribuição na geração de lactato pelo metabolismo de glutamina em células de mamífero deve ser considerada. As vias envolvidas são conhecidas e documentadas na literatura (GÓDIA; CAIRÓ, 2006; SCHNEIDER; MARISON; VON STOCKAR, 1996). Porém, a aparente ineficiência no processamento da glicólise e da glutaminólise não refletiu em uma diminuição considerável da velocidade específica máxima de crescimento celular ou da concentração celular máxima observados no cultivo.

A relação lactato/célula ($Y_{LAC/X}$) e a velocidade específica de produção de lactato (q_{LAC}) foram mais altos do que aqueles observados por Fernández-Núñez *et al.* (2012). Não é claro, porém, o motivo pelo qual as células produziram uma maior quantidade do metabólito. Pasternak *et al.* (1991) associam o aumento na velocidade específica de produção de lactato com fatores de estresse. No entanto, o fenômeno ocorre em decorrência de um aumento na velocidade específica de consumo de glicose que, na situação do cultivo BHK-B, foi semelhante à observada por Fernández-Núñez *et al.* (2012).

Os fatores de conversão $Y_{X/GLC}$, $Y_{X/GLN}$ e as velocidades específicas de consumo de substrato q_{GLN} e de produção de amônio q_{NH_4} calculados também foram muito semelhantes aos obtidos por Fernández-Núñez *et al.* (2012) (Tabela 5.1).

5.3.2 Cultivo em perfusão BHK-P

O cultivo de células BHK-21 em perfusão foi realizado em biorreator com volume de trabalho de 1,5 L (Figura 5.13). A necessidade da utilização de um volume maior foi em função da posição do *spin-filter* no interior do biorreator. Por estar montado no eixo do impelidor o filtro foi posicionado acima das pás de agitação e, para que este tivesse uma área satisfatória imersa no meio de cultura, foi necessário o aumento do volume de trabalho.

Figura 5.13 – Biorreator Biostat B com *spin-filter* acoplado ao eixo do impelidor utilizado nos experimentos.

A primeira etapa do cultivo em perfusão teve início com uma batelada, ou seja, sem alimentação ou retirada de meio de cultura do reator, e foi denominada fase batelada. Num segundo momento, as bombas foram ligadas e o cultivo passou a ser operado de modo contínuo sem retenção celular, com retirada de meio do espaço externo ao *spin-filter*. A partir do momento em que o cultivo atingiu o estado estacionário, meio de cultivo passou a ser retirado do interior do *spin-filter*, instante inicial da fase de perfusão.

Os perfis de crescimento celular, consumo de substratos e produção de metabólitos deste cultivo estão representados nas Figuras 5.14 e 5.15.

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial do cultivo em perfusão foi de $1,47 \text{ dia}^{-1}$, próxima da velocidade obtida no cultivo anterior em batelada BHK-B ($1,37 \text{ dia}^{-1}$). Também foram próximas a duração da fase *lag* (aproximadamente 18 horas) e a duração da fase exponencial de crescimento (aproximadamente 32 horas). Porém, a concentração celular máxima observada foi de $2,9 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$, 45% abaixo da concentração celular máxima observada no cultivo em batelada e, portanto, abaixo do esperado.

Figura 5.14 – Perfis de crescimento celular, concentrações de glicose e de lactato durante o cultivo em perfusão de células BHK-21. X_v : concentração de células viáveis; X_v^{sf} : concentração de células viáveis de amostra do interior do *spin-filter* (perfundido); t_0 contínuo: início do cultivo em modo contínuo; antiespumante: início da utilização de antiespumante no cultivo; t_0 perfusão: início da perfusão; t_1 perfusão: término da perfusão.

Figura 5.15 – Perfis de crescimento celular, concentrações de glutamina, de amônio e de glutamato durante o cultivo em perfusão de células BHK-21. X_v : concentração de células viáveis; X_v^{sf} : concentração de células viáveis de amostra do interior do *spin-filter* (perfundido); t_0 contínuo: início do cultivo em modo contínuo; antiespumante: início da utilização de antiespumante no cultivo; t_0 perfusão: início da perfusão; t_1 perfusão: término da perfusão.

As velocidades específicas de consumo de substratos e produção de metabólitos (q_{GLC} , q_{GLN} , q_{LAC} , q_{NH4}) (Tabela 5.1), calculadas na fase exponencial da fase batelada deste cultivo, revelaram que glicose e glutamina foram consumidas mais rapidamente do que no cultivo BHK-B. Lactato e amônio também foram produzidos mais rapidamente pelas células. Sviderskaya *et al.* (1996) observaram um aumento na velocidade de consumo de glicose, semelhante ao estímulo por insulina, em células BHK expostas a diferentes fatores de estresse. Pasternak *et al.* (1991) associam o aumento na velocidade de produção de lactato ao aumento da velocidade de consumo de glicose, correlacionando ambos com fatores de estresse. Cruz *et al.* (2000) correlacionam o aumento da velocidade de consumo de glicose e glutamina com o aumento da concentração de amônio e lactato, pelo fato de as células precisarem de uma maior quantidade de energia para manter a homeostase. As observações realizadas neste cultivo tanto em relação à concentração celular quanto em relação aos parâmetros q_S e q_P podem ser, portanto, relacionadas ao estresse causado pela rotação do *spin-filter*. A baixa concentração celular máxima, observada no final da fase batelada do cultivo BHK-P, pode ter sido ocasionada tanto pela maior concentração de metabólitos quanto pela exaustão de glutamina no meio de cultivo.

As bombas de alimentação de meio fresco e retirada de meio de cultivo foram ligadas a uma vazão de 1,2 L dia⁻¹, correspondente à taxa de diluição 0,8 dia⁻¹, no terceiro dia após a inoculação. As amostras subsequentes revelaram um decréscimo na concentração celular, que atingiu pouco mais de 1×10^6 céls mL⁻¹. Essa diminuição foi devida ao fato de o cultivo já ter saído da fase exponencial no momento em que as bombas foram ligadas e, portanto, as células cresciam com uma velocidade inferior a 0,8 dia⁻¹.

O aumento da concentração de nutrientes promovido pela alimentação de meio fresco e a diminuição da concentração de metabólitos através da retirada de meio de cultivo fizeram com que as células voltassem a crescer e a concentração celular aumentasse até um valor próximo aos $2,9 \times 10^6$ céls mL⁻¹ observados no final da fase batelada.

A partir do dia 13 do cultivo, antiespumante passou a ser adicionado diretamente no biorreator de modo contínuo, a uma vazão estimada em 0,1 mL h⁻¹. A

formação de espuma na interface ar-líquido, devido principalmente à presença de soro fetal bovino no meio de cultura e aeração por aspersor, dificultava a retirada de maneira representativa de meio de cultivo pelo tubo coletor, de modo que seria difícil alcançar um estado estacionário mantendo o *set-up* inalterado. Simultaneamente ao início da adição de antiespumante, foi observado um decréscimo da concentração celular, que voltou a aumentar aproximadamente dois dias depois.

O estado estacionário foi alcançado no dia 19. Os cálculos dos parâmetros associados à fase de cultivo contínuo foram realizados entre os dias 19 e 23 e encontram-se na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Comparação dos parâmetros fisiológicos calculados no cultivo BHK-P com aqueles calculados em outros dois cultivos operados em modo contínuo célula BHK-21

Parâmetros		BHK-P		Cruz, Moreira e Carrondo (1999)	Linz <i>et al.</i> (1997)
<i>Spin-filter?</i>		Sim		Não	Não
Fase	Batelada	Contínuo	Perfusão	Contínuo	Contínuo
Intervalo	Expon.	Est. estac.	Est. estac.	Est. estac.	Est. estac.
μ (dia ⁻¹)	1,37	0,80	0,06	0,3	1,05
$X_{V\text{M}\text{AX}}$ (10 ⁶ céls mL ⁻¹)	2,9	3,2 ± 0,3	14,5 ± 0,8	0,90–1,75	2–8,5
$Y_{X/\text{GLC}}$ (10 ⁹ céls mmol ⁻¹)	0,19	0,21 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,1–0,9	0,77–3,55
$Y_{X/\text{GLN}}$ (10 ⁹ céls mmol ⁻¹)	0,95	1,07 ± 0,1	0,33 ± 0,02	0,4–0,8	0,12–0,99
$Y_{\text{LAC}/X}$ (mmol 10 ⁻⁹ céls ⁻¹)	12,01	12,11 ± 1,08	39,49 ± 2,53	0,1–12	0,07–0,86
$Y_{\text{NH}_4/X}$ (mmol 10 ⁻⁹ céls ⁻¹)	0,78	0,37 ± 0,07	1,43 ± 0,11	2,1–3,0	0,27–1,07
$Y_{\text{LAC}/\text{GLC}}$ (mol mol ⁻¹)	2,25	2,53 ± 0,07	1,84 ± 0,03	1,4–1,6	0,75–0,95
$Y_{\text{NH}_4/\text{GLN}}$ (mol mol ⁻¹)	0,75	0,39 ± 0,06	0,47 ± 0,04	1,0–1,1	0,62–1,00
q_{GLC} (mmol 10 ⁻⁹ céls ⁻¹ dia ⁻¹)	7,88	3,80 ± 0,34	1,27 ± 0,08	0,3–2,9	0,29–1,36
q_{GLN} (mmol 10 ⁻⁹ céls ⁻¹ dia ⁻¹)	1,55	0,75 ± 0,07	0,18 ± 0,00	0,4–3,6	0,26–2,52
q_{LAC} (mmol 10 ⁻⁹ céls ⁻¹ dia ⁻¹)	17,72	9,69 ± 0,86	2,33 ± 0,01	0,4–0,8	0,07–0,9
q_{NH_4} (mmol 10 ⁻⁹ céls ⁻¹ dia ⁻¹)	1,15	0,29 ± 0,05	0,08 ± 0,00	0,6–0,9	0,29–1,13

A concentração celular obtida nesse estado estacionário foi igual a $(3,2 \pm 0,3) \times 10^6$ céls mL⁻¹, ainda inferior àquela observada no cultivo BHK-B e ligeiramente superior à observada na fase batelada deste cultivo. Os valores dos fatores de conversão glicose à célula e glutamina à célula ($Y_{X/GLC}$, $Y_{X/GLN}$) mostraram uma discreta melhora no aproveitamento dos substratos na geração de células em relação à fase batelada, enquanto que a relação lactato/célula ($Y_{LAC/X}$) foi muito semelhante. O fator de conversão glutamina a amônio ($Y_{NH4/GLN}$) foi consideravelmente menor, indicando que menos glutamina foi oxidada na glutaminólise.

As velocidades específicas de consumo de substratos e de produção de metabólitos na fase contínua foram menores do que aquelas observadas na fase batelada do cultivo, provavelmente em função de a velocidade específica de crescimento celular também ser inferior. O fenômeno está de acordo com o observado por Banik e Heath (1995) em hibridoma H22.

A perfusão foi iniciada no dia 24, a partir da retirada de meio de cultivo do interior do *spin-filter*. A taxa de diluição foi mantida em 0,8 dia⁻¹ ao longo de todo o cultivo. Em geral, sistemas operados em perfusão permitem que sejam impostas taxas de diluição muito superiores à velocidade específica máxima de crescimento celular, a depender da eficiência do sistema de retenção utilizado. No caso do *spin-filter* interno, são relatadas eficiências entre 75 e 99% (CASTILHO; MEDRONHO, 2002). Dessa forma, pode-se operar com taxas de diluição entre 4 e 100 vezes o μ_{MAX} da célula. Porém, para que fosse imposta uma taxa de diluição maior que o μ_{MAX} das células BHK-21 cultivadas, seriam necessários no mínimo 2,25 L de meio de cultura por dia, quantidade que excederia a capacidade disponível para preparo e esterilização.

Durante 12 dias, o cultivo foi operado como perfusão e o estado estacionário foi estabelecido entre os dias 32 e 35. A concentração celular nesse estado estacionário foi de $(14,5 \pm 0,8) \times 10^6$ céls mL⁻¹, muito superior às concentrações obtidas em batelada ou na fase de cultivo contínuo sem retenção celular. A Tabela 5.3 apresenta os dados avaliados para a definição do estado estacionário das fases de cultivo contínuo e perfusão do cultivo BHK-P segundo a metodologia adotada.

Tabela 5.3 – Período, tempos de residência e coeficiente de variação da concentração celular (X_V), de glicose e de lactato nos estados estacionários do cultivo BHK-P fase contínuo e fase perfusão

Fase	Período (dia–dia)	Tempos de residência	CV (%)		
			X_V	[glicose]	[lactato]
Contínuo	19,8–23,9	3,28	8,76	6,24	3,21
Perfusão	32,3–35,1	2,24	5,70	8,27	1,86

O fator de conversão glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) calculado no estado estacionário da perfusão mostra que glicose foi utilizada pela célula com maior eficiência no metabolismo energético e biossíntese do que nas outras situações, tanto do cultivo BHK-P quanto do cultivo BHK-B. As velocidades específicas de consumo de glicose (q_{GLC}) e de produção de lactato (q_{LAC}) também foram menores. Na perfusão, a concentração de glicose e glutamina residuais observadas foram baixas. Nessa situação, q_{GLC} deve ser menor do que quando a disponibilidade do carboidrato é maior, o que provoca a diminuição de q_{LAC} (CRUZ *et al.*, 1999). A diminuição do $Y_{LAC/GLC}$ nessa situação também foi observada por Linz *et al.* (1997).

As velocidades específicas de consumo de glutamina e de produção de amônio também foram menores, e o fator de conversão glutamina a amônio ($Y_{NH4/GLN}$) revela que o metabolismo de glutamina foi mais eficiente, produzindo mais amônio por glutamina consumida.

Os parâmetros calculados para os estados estacionários do cultivo BHK-P na fase contínuo e na fase perfusão estão próximos daqueles observados por Cruz, Moreira e Carrondo (1999) e por Linz *et al.* (1997) em cultivos contínuos com diferentes concentrações de glicose e glutamina no meio de cultura à exceção dos parâmetros relacionados à produção de lactato. Esta foi consideravelmente maior no cultivo BHK-P, provavelmente devido ao estresse causado pelo *spin-filter*.

Convém observar ainda que a maior preocupação associada à utilização do *spin-filter* como sistema de retenção celular é a obstrução dos poros, causada pelo acúmulo de células e *debris* ao longo do cultivo (DEO; MAHADEVAN; FUCHS, 1996; ESCLADE; CARREL; PÉRINGER, 1991; VALLEZ-CHETREANU *et al.*, 2007; YABANNAVAR; SINGH; CONNELLY, 1992, 1994). Porém, o fenômeno não foi

observado ao longo deste cultivo, provavelmente pelo fato de a taxa de diluição imposta ser suficientemente baixa.

Durante o estado estacionário da fase perfusão, a velocidade específica de crescimento celular foi baixa, devido a alta eficiência do *spin-filter* e da taxa de diluição consideravelmente baixa para um processo em perfusão. O fator de eficiência h do *spin-filter* utilizado, calculado utilizando as duas amostras coletadas durante o estado estacionário, foi igual a 0,074. A velocidade específica de crescimento celular no estado estacionário da perfusão, calculada pela Equação 3.7, foi igual a $0,06 \text{ dia}^{-1}$, ou 4% da velocidade específica máxima, observada na fase batelada do cultivo.

Nessa situação, em que a célula cresce com velocidade específica muito baixa, substrato é consumido principalmente para a manutenção celular (FACCIOTTI, 2001; VILLADSEN; NIELSEN; LIDÉN, 2011).

Pirt (1975), definiu o coeficiente de manutenção celular como sendo a parcela do consumo de substrato por cada célula que não é destinada a crescimento (Equação 5.1):

$$q_S = m_S + \frac{1}{Y_{X/S}^{true}} \cdot \mu \quad (5.1)$$

onde m_S é o coeficiente de manutenção celular e $Y_{X/S}^{true}$ é o fator de conversão substrato à célula verdadeiro.

Na perfusão, a concentração celular é provavelmente inferior àquela prevista utilizando o modelo de Monod (Figura 3.6), pois este não leva em consideração o coeficiente de manutenção celular (m_S). Em situações onde o μ é baixo, o m_S provavelmente não é desprezível (PIRT, 1975). A simulação das equações de X e S em função de D utilizando o modelo de Monod com o coeficiente de manutenção celular pode ser observada na Figura 5.16.

Com relação à glicose, o coeficiente de manutenção celular pode ser estimado a partir do gráfico q_{GLC} vs. μ . Foram plotados os dados referentes aos estados estacionários da fase de cultivo contínuo e da fase perfusão de BHK-P para a estimativa deste parâmetro (Figura 5.17). Esta pode ser considerada apenas uma

aproximação do que seria o m_S para a célula BHK-21. Para que o número obtido fosse mais próximo do real, os q_{GLC} deveriam ser obtidos a partir de diversos estados estacionários em diferentes taxas de diluição com glicose limitante, conforme realizado por Pronk et al. (1990) em cultivos com *Thiobacillus acidophilus* limitados por glicerol.

Figura 5.16 – Cinética de crescimento de *A. aerogenes* em cultivo em quimiostato com glicerol como substrato limitante. As linhas contínuas representam os cálculos utilizando o modelo de Monod incluindo o coeficiente de manutenção celular. $\mu_{MAX} = 1,0 \text{ h}^{-1}$; $K_S = 0,01 \text{ g glicerol (g céls h)}^{-1}$; $Y_{X/S}^{true} = 1,82 \text{ g glicerol (g cél)}^{-1}$ (VILLADSEN; NIELSEN; LIDÉN, 2011).

Figura 5.17 – Determinação gráfica do coeficiente de manutenção celular para a célula BHK-21 utilizando os dados dos estados estacionários do cultivo BHK-P.

A partir da Figura 5.17 pode-se estimar o coeficiente de manutenção celular (m_s), o coeficiente linear da regressão utilizando os dois pontos, cujo valor é $1,06 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ céls}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Com base nessa estimativa e sendo o q_{GLC} no estado estacionário da perfusão igual a $1,27 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ céls}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, é possível concluir que na perfusão cerca de 83% do consumo de glicose é direcionado para a manutenção celular. Desta forma, trabalhando numa condição onde a taxa de diluição é mais alta seria esperada a obtenção de concentrações celulares mais altas do que a obtida no cultivo BHK-P com uma taxa de diluição de $0,8 \text{ dia}^{-1}$.

6 CONCLUSÕES

Com base no conteúdo exposto no capítulo 5, pode-se concluir deste trabalho que:

1. Células de *Drosophila melanogaster* linhagem S2, cultivadas em perfusão, utilizando *spin-filter* interno como sistema de retenção celular e meio SF 900 II livre de soro fetal bovino, apresentaram sinais de estresse por cisalhamento que podem estar relacionado ao *spin-filter*. Tal fato pode ter inviabilizado seu cultivo na presença do dispositivo.
2. A suplementação do meio de cultura SF 900 II com cisteína provoca um aumento na velocidade específica máxima de crescimento da célula S2. O fenômeno foi possível de ser observado na condição suplementada apenas com cisteína e na condição em que além da cisteína foram adicionados asparagina, prolina e serina (condições C e T).
3. A célula S2 é capaz de adaptar seu metabolismo em função da disponibilidade nutricional a que é submetida, fato evidenciado pelo aumento da velocidade específica máxima de crescimento e pelo fator de conversão glicose à célula observados para as condições suplementadas com cisteína (condições C e T).
4. A célula S2 atinge concentrações celulares máximas ligeiramente maiores nas condições em que há suplementação de cisteína no meio de cultura (condições C e T), sendo um indicativo de que esse aminoácido pode ser nutriente limitante do cultivo de células S2 em meio SF 900 II. No entanto, estatisticamente os valores de concentração celular máxima não são diferentes entre si.
5. Células S2 crescem com velocidade específica máxima maior em meio SF 900 II suplementado com 0,131 g L⁻¹ de cisteína (condição C-2X). A produção específica máxima de GPV acontece porém, na condição em que o meio de cultura é suplementado com 0,262 g L⁻¹ de cisteína (condição C-3X). A concentração celular máxima não apresenta diferenças estatisticamente

significativas entre as condições suplementadas com diferentes concentrações de cisteína.

6. Células BHK-21, cultivadas na presença de *spin-filter* interno, apresentam velocidades específicas de consumo de substrato e de produção de metabólitos mais altas do que as observadas em cultivo sem a presença do dispositivo, indicando que o *spin-filter* pode ser fator de estresse para a célula.
7. Foi possível atingir dois estados estacionários, segundo os critérios adotados, no cultivo contínuo com células BHK-21 – um deles durante a fase de cultivo contínuo sem reciclo de células e o outro durante a fase perfusão.
8. A concentração celular obtida no estado estacionário de cultivo em perfusão foi 4,5 vezes maior que a obtida na fase de cultivo contínuo sem reciclo celular, e aproximadamente 3 vezes maior que a obtida em cultivo realizado em batelada.
9. A taxa de diluição imposta no cultivo em perfusão ($0,8 \text{ dia}^{-1}$), associada à eficiência de retenção celular do *spin-filter* (92,6%), fizeram com que a velocidade específica de crescimento celular no estado estacionário da perfusão fosse baixa, aproximadamente $0,06 \text{ dia}^{-1}$. Nessa situação, o coeficiente de manutenção celular não é desprezível e a concentração celular máxima observada é inferior àquela prevista pelo modelo de Monod.
10. É possível cultivar células BHK-21, adaptadas a crescimento em suspensão, em altas concentrações celulares em escala laboratorial, utilizando biorreator de bancada e *spin-filter* interno como sistema de retenção celular.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados e das conclusões deste trabalho, sugere-se:

- Cultivar as células de *Drosophila melanogaster* linhagem S2 em meio contendo soro fetal bovino ou outro componente protetor contra o cisalhamento, como o Pluronic F-68. O meio de cultura utilizado neste trabalho é livre de soro fetal bovino, que sabe-se ter função protetora contra este tipo de estresse. Eventualmente a sua adição ou a adição de outro componente protetor, possa viabilizar o cultivo dessas células em perfusão com *spin-filter*.
- Realizar novamente um cultivo em perfusão com células BHK-21 em biorreator do tipo tanque agitado com *spin-filter* interno, aplicando taxas de diluição mais altas do que a utilizada neste trabalho, talvez diminuindo a escala do processo para que não seja necessário o preparo de quantidades muito maiores de meio de cultura. Dessa forma, seria possível explorar a vantagem do sistema de retenção obtendo maior produtividade em células.

REFERÊNCIAS³

AGUIAR, M. A. **Estudo cinético de células de *Drosophila melanogaster* transfectadas para a produção da glicoproteína da raiva em biorreator.** 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ALTAMIRANO, C.; GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *in vitro*. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Ed.). **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. cap. 4, p. 105-119.

ALTAMIRANO, C. *et al.* Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. **J. Biotechnol.**, v. 110, n. 2, p. 171-9, 2004.

AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology:** from biopharmaceuticals to gene therapy. London: Taylor & Francis Group, 2008. cap. 4, p. 75-110.

ASTRAY, R. M. *et al.* Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. **Biotechnol. J.**, v. 3, n. 1, p. 98-103, 2008.

AUGUSTO, E. F. P.; OLIVEIRA, M. S. Processos com células animais. In: SCHMIDELL, W. *et al.* (Ed.). **Biotecnologia industrial.** São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 3, cap. 24, p. 547-582.

AVGERINOS, G. C. *et al.* Spin filter perfusion system for high density cell culture: production of recombinant urinary type plasminogen activator in CHO cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 8, n. 1, p. 54-58, 1990.

BACHMANN, A. S. *et al.* A simple method for the rapid purification of *copia* virus-like particles from *Drosophila* Schneider 2 cells. **J. Virol. Methods.**, v. 115, n. 2, p. 159-165, 2004.

³ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

BALDI, L. *et al.* Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, n. 5, p. 677-84, 2007.

BANIK, G. G.; HEATH, C. A. Hybridoma growth and antibody production as a function of cell density and specific growth rate in perfusion culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 48, n. 3, p. 289-300, 1995.

BANKS, D. J.; HUA, G.; ADANG, M. J. Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. **Insect Biochem. Molec.**, v. 33, n. 5, p. 499-508, 2003.

BATISTA, F. R. X. *et al.* Behavior of wild-type and transfected S2 cells cultured in two different media. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 163, n. 1, p. 1-13, 2011.

BATISTA, F. R. X. *et al.* Influence of culture conditions on recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells producing rabies virus glycoprotein cultivated in serum-free medium. **Biologicals**, v. 37, n. 2, p. 108-118, 2009.

BATISTA, F. R. X. *et al.* Formulation of a protein-free medium based on IPL-41 for the sustained growth of *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 11-22, 2008.

BEBBINGTON, C. R. *et al.* High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 2, p. 169-75, 1992.

BÉDARD, C.; TOM, R.; KAMEN, A. Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: Insights into growth limitation and metabolism. **Biotechnol. Progr.**, v. 9, n. 6, p. 615-624, 1993.

BENMAAMAR, R. *et al.* High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest virus expression vector. **J. Biotechnol.**, v. 139, n. 4, p. 283-290, 2009.

BHATIA, R. *et al.* Insect cell physiology. **Cytotechnology**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 1997.

BÖDECKER, B. G. D. *et al.* Production of recombinant factor VIII from perfusion cultures. In: SPIER, R. E.; GRIFFITHS, J. B.; BERTHOLD, W. (Ed.). **Animal cell technology: products of today, prospects for tomorrow**. Oxford: Butterworth Heinemann, 1994. p. 580-583.

BOLLATI-FOGOLÍN, M.; COMINI, M. A. Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. cap. 3, p. 39-73.

BOVO, R. *et al.* Kinetic response of a *Drosophila melanogaster* cell line to different medium formulations and culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 23-35, 2008.

BRIGGS, D. J. The role of vaccination in rabies prevention. **Curr. Opin. Virol.**, v. 2, n. 3, p. 309-314, 2012.

BROECK, J. V. *et al.* Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 Cells. **J. Neurochem.**, v. 64, n. 6, p. 2387-2395, 1995.

BURROWS, M. T. A method of furnishing a continuous supply of new medium to a tissue culture *In Vitro*. **Anat. Rec.**, v. 6, n. 3, p. 141-144, 1912.

BUTLER, M. **Animal cell culture and technology**. 2nd ed. London: BIOS Scientific Publishers, 2004. 256p. (The Basics).

_____. Post-translational modification of recombinant proteins. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. cap. 6, p. 129-146.

BUTLER, M.; JENKINS, H. Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. **J. Biotechnol.**, v. 12, n. 2, p. 97-110, 1989.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A. Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures. In: SCHÜGERL, K. *et al.* **Tools and applications of biochemical engineering science**. Springer Berlin / Heidelberg, 2002. v. 74, p. 129-169.

_____. Animal cell separation. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. cap. 11, p. 273-293.

CHA, H. J. *et al.* Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochem. Eng. J.**, v. 24, n. 3, p. 225-233, 2005.

CHERBAS, L.; MOSS, R.; CHERBAS, P. Transformation techniques for *Drosophila* cell lines. In: LAWRENCE, S. B. G.; ERIC, A. F. (Ed.). **Methods in cell biology**. Academic Press, 1994. v. 44, cap. 9, p. 161-179.

CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; CARDERO, A. F. Bioreactors for animal cells. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. cap. 9, p. 221-258.

CLEMENTS, D. E. *et al.* Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. **Vaccine**, v. 28, n. 15, p. 2705-2715, 2010.

COMPTON, M. E. Elements of *In Vitro* research. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant tissue culture, development, and biotechnology**. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group, 2011. cap. 6, p. 57-64.

COTTER, T. G.; AL-RUBEAI, M. Cell death (apoptosis) in cell culture systems. **Trends Biotechnol.**, v. 13, n. 4, p. 150-5, 1995.

COX, J. H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. **Infect. Immun.**, v. 16, n. 3, p. 754-9, 1977.

CREGG, J. *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnol.**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.

CRUZ, H. J. *et al.* Process development of a recombinant antibody/interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. **J. Biotechnol.**, v. 96, n. 2, p. 169-83, 2002.

CRUZ, H. J. *et al.* Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, n. 5, p. 579-585, 1999.

CRUZ, H. J. *et al.* Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 27, n. 1, p. 43-52, 2000.

CRUZ, H. J.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 66, n. 2, p. 104-113, 1999.

_____. Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures. **J. Biotechnol.**, v. 80, n. 2, p. 109-118, 2000.

DE JESUS, M.; WURM, F. M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 78, n. 2, p. 184-8, 2011.

DEML, L.; WOLF, H.; WAGNER, R. High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected *Drosophila* Schneider-2 cells. **J. Virol. Methods.**, v. 79, n. 2, p. 191-203, 1999.

DEO, Y. M.; MAHADEVAN, M. D.; FUCHS, R. Practical considerations in operation and scale-up of spin-filter based bioreactors for monoclonal antibody production. **Biotechnol. Progr.**, v. 12, n. 1, p. 57-64, 1996.

DOVERSKOG, M.; HAN, L.; HÄGGSTRÖM, L. Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. **Cytotechnology**, v. 26, n. 2, p. 91-102, 1998.

DOVERSKOG, M. *et al.* Physiology of cultured animal cells. **J. Biotechnol.**, v. 59, n. 1-2, p. 103-115, 1997.

DREWS, M. *et al.* Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by ¹H/¹⁵N NMR. **J. Biotechnol.**, v. 78, n. 1, p. 23-37, 2000.

DREWS, M.; PAALME, T.; VILU, R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. **J. Biotechnol.**, v. 40, n. 3, p. 187-198, 1995.

DRUGMAND, J. C.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 5, p. 1140-1157, 2012.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 20, n. 6, p. 700-707, 2009.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, n. 3168, p. 501-504, 1955.

_____. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v. 130, n. 3373, p. 432-7, 1959.

ESCLADE, L. R. J.; CARREL, S.; PÉRINGER, P. Influence of the screen material on the fouling of spin filters. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 38, n. 2, p. 159-168, 1991.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W. *et al.* (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 2, p. 223-246.

FERNANDEZ, J. M.; HOEFFLER, J. P. (Ed.). **Gene expression systems: using nature for the art of expression**, San Diego: Academic Press, 1999. 480 p.

FERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E. G. *et al.* Padronização da etapa de preparo de inóculo para biorreator usando células BHK-21 em suspensão. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE TECNOLOGÍA DE CULTIVOS CELULARES, V. 2012, Santa Fe. **Resumo**. Livro de resumos, p. 30.

FERRANCE, J. P.; GOEL, A.; ATAAL, M. M. Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 42, n. 6, p. 697-707, 1993.

FERRER-MIRALLES, N. *et al.* Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microb. Cell. Fact.**, v. 8, n. p. 17, 2009.

FREEDMAN, R. B. Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. **Trends Biochem. Sci.**, v. 9, n. 10, p. 438-441, 1984.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 672 p.

GALESI, A. L. L. **Cultivo de células de *Drosophila melanogaster* em diferentes formulações de meios de cultura livres de soro visando a produção da glicoproteína do vírus da raiva**. 2007. 177 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

GALESI, A. L. L. *et al.* Growth of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 73-81, 2008.

GALESI, A. L. L. *et al.* Design of culture media for *Drosophila melanogaster* S2 cells producing recombinant G glycoprotein from rabies virus. In: SMITH, R. **Cell technology for cell products**. New York: Springer, 2007. p. 403-413.

GALESI, A. L. L.; PEREIRA, C. A.; MORAES, A. M. Culture of transgenic *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells in serum-free media based on TC100 basal medium. **Biotechnol. J.**, v. 2, n. 11, p. 1399-1407, 2007.

GESERICK, C. *et al.* Enhanced productivity during controlled proliferation of BHK cells in continuously perfused bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 69, n. 3, p. 266-274, 2000.

GIBSON, K. R. *et al.* Expression of dopamine β -hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 Cells. Evidence for a mechanism of membrane binding other than uncleaved signal peptide. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 13, p. 9490-5, 1993.

GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Cell metabolism. In: OZTURK, S. S.; HU, W.-S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. Boca Raton: CRC Press, 2006. cap. 4, p. 81-112.

GOOCHEE, C. F.; MONICA, T. Environmental effects on protein glycosylation. **Nat. Biotechnol.**, v. 8, n. 5, p. 421-427, 1990.

HAYTER, P. M. *et al.* The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 42, n. 9, p. 1077-1085, 1993.

HILLER, G. W.; CLARK, D. S.; BLANCH, H. W. Transient responses of hybridoma cells in continuous culture to step changes in amino acid and vitamin concentrations. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, n. 3, p. 303-321, 1994.

HIMMELFARB, P.; THAYER, P. S.; MARTIN, H. E. Spin filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension. **Science**, v. 164, n. 879, p. 555-7, 1969.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. *et al.* (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 2, cap. 6, p. 93-122.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2003.

JARVIS, D. L. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. **Virology**, v. 310, n. 1, p. 1-7, 2003.

JEON, H. K. *et al.* Functional expression of recombinant tumstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Biotechnol. Lett.**, v. 25, n. 3, p. 185-189, 2003.

JORGE, S. A. C. *et al.* Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 51-59, 2008.

KALLEL, H. *et al.* Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. **J. Biotechnol.**, v. 95, n. 3, p. 195-204, 2002.

KALLEL, H. *et al.* A novel process for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-l bioreactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, n. 5, p. 441-446, 2003.

KERRIGAN, J. J. *et al.* Production of protein complexes via co-expression. **Protein Expres. Purif.**, v. 75, n. 1, p. 1-14, 2011.

KIRKPATRICK, R. B. *et al.* Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 34, p. 19800-19805, 1995.

KIRKPATRICK, R. B.; SHATZMAN, A. *Drosophila* S2 system for heterologous gene expression. In: FERNANDEZ, J. M.; HOEFFLER, J. P. (Ed.). **Gene expression systems: using nature for the art of expression**. San Diego: Academic Press, 1999. cap. 11, p. 289-330.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, n. 2, p. 135-142, 2002.

LANGE, H.; TAILLANDIER, P.; RIBA, J.-P. Effect of high shear stress on microbial viability. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 76, n. 5, p. 501-505, 2001.

LEE, J. *et al.* Expression of recombinant erythropoietin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.**, v. 36, n. 6, p. 348-350, 2000.

LEMOS, M. A. N. *et al.* Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I: design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. **J. Biotechnol.**, v. 143, n. 2, p. 103-110, 2009.

LÉO, P. *et al.* Animal cells: basic concepts. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. cap. 2, p. 13-37.

LINZ, M. *et al.* Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. **Biotechnol. Progr.**, v. 13, n. 4, p. 453-63, 1997.

LUNDSTROM, K. Semliki Forest virus-based expression for versatile use in receptor research. **J. Recept. Signal. Transduct. Res.**, v. 22, n. 1-4, p. 229-40, 2002.

LUNDSTROM, K. *et al.* Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. **FEBS Lett.**, v. 504, n. 3, p. 99-103, 2001.

MA, N. N. *et al.* Quantitative studies of cell-bubble interactions and cell damage at different Pluronic F-68 and cell concentrations. **Biotechnol. Progr.**, v. 20, n. 4, p. 1183-1191, 2004.

MCQUEEN, A.; BAILEY, J. Influence of serum level, cell line, flow type and viscosity on flow-induced lysis of suspended mammalian cells. **Biotechnol. Lett.**, v. 11, n. 8, p. 531-536, 1989.

MENDONÇA, R. Z. *et al.* Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 83-91, 2008.

MENDONÇA, R. Z.; PALOMARES, L. A.; RAMÍREZ, O. T. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. **J. Biotechnol.**, v. 72, n. 1-2, p. 61-75, 1999.

MICHAELS, J. D.; MALLIK, A. K.; PAPOUTSAKIS, E. T. Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? **Biotechnol. Bioeng.**, v. 51, n. 4, p. 399-409, 1996.

MILLAR, N. S. *et al.* Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. **J. Exp. Biol.**, v. 198, n. 9, p. 1843-50, 1995.

MONOD, J. **Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes**. Paris: Hermann & Cie., 1942. 210 p.

MORAES, A. M. *et al.* *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. **Biotechnol. Adv.**, v. n. p. 2011.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Culture media for animal cells. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. cap. 5, p. 111-128.

MOREIRA, J. L. *et al.* Serum-free and serum-containing media for growth of suspended BHK aggregates in stirred vessels. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 17, n. 5, p. 437-444, 1995.

NEERMANN, J.; WAGNER, R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 166, n. 1, p. 152-169, 1996.

NIELSEN, J. Microbial process kinetics. In: RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. (Ed.). **Basic biotechnology**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 127-150, cap. 6,

NIVITCHANYONG, T. *et al.* Anti-apoptotic genes Aven and E1B-19K enhance performance of BHK cells engineered to express recombinant factor VIII in batch and low perfusion cell culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 98, n. 4, p. 825-841, 2007.

NOLLERT, M. U.; DIAMOND, S. L.; MCINTIRE, L. V. Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 38, n. 6, p. 588-602, 1991.

ÖHMAN, L.; LJUNGGREN, J.; HÄGGSTRÖM, L. Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, n. 6, p. 1006-1013, 1995.

PAMBOUKIAN, M. M. **Estudo da atividade respiratória de linhagens selvagens e transfectadas de células de insetos através de cultivos em biorreatores**. 2007. 181 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PAMBOUKIAN, M. M. *et al.* Insect cells respiratory activity in bioreactor. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 37-44, 2008.

PASTERNAK, C. A. *et al.* Regulation of glucose uptake by stressed cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 149, n. 2, p. 324-31, 1991.

Institut Pasteur. **Rabies**. Disponível em:
<<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/en/press/press-kits/rabies/rabies>> Acesso em: 2 dez. 2012

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, n. 5, p. 340-347, 1997.

PERRET, B. G. *et al.* Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in *Drosophila* Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of G-protein coupled receptors. **Protein Expres. Purif.**, v. 31, n. 1, p. 123-132, 2003.

PETCH, D.; BUTLER, M. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. **J. Cell. Physiol.**, v. 161, n. 1, p. 71-6, 1994.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. New York: John Wiley & Sons, 1975. 274 p.

PRONK, J. T. *et al.* Heterotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* in batch and chemostat cultures. **Arch. Microbiol.**, v. 153, n. 4, p. 392-398, 1990.

RADFORD, K. M.; REID, S.; GREENFIELD, P. F. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 56, n. 1, p. 32-44, 1997.

RAMÍREZ, O. T. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (Ed.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. Foreword, p. xxxv-xxxvii.

ROSSI, N. **Efeito da temperatura na otimização da produção de glicoproteína do vírus da raiva em cultivos em suspensão de células recombinantes de *Drosophila melanogaster* S2**. 2008. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 65, n. 4, p. 363-72, 2004.

SCHMIDT, M.; HOFFMAN, D. R. Expression systems for production of recombinant allergens. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 128, n. 4, p. 264-70, 2002.

SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 27, n. APR, p. 353-365, 1972.

SCHNEIDER, M.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. **J. Biotechnol.**, v. 46, n. 3, p. 161-185, 1996.

SMITH, J. E. **Biotechnology Principles**. Workingham: Van Nostrand Reinhold, 1985. 119 p. (Aspects of microbiology).

SVIDERSKAYA, E. V. *et al.* Cellular stress causes accumulation of the glucose transporter at the surface of cells independently of their insulin sensitivity. **J. Membr. Biol.**, v. 149, n. 2, p. 133-140, 1996.

SWIECH, K. **Caracterização cinética e fisiológica de células de *Drosophila melanogaster* S2 para produção de glicoproteína do vírus da raiva (GPV) recombinante**. 2007. 306 f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SWIECH, K. *et al.* Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. **Biotechnol. Appl. Bioc.**, v. 49, n. 1, p. 41-49, 2008a.

SWIECH, K. *et al.* Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by *Drosophila melanogaster* S2 cells through control of culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2008b.

SWIECH, K. *et al.* Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 61-66, 2008c.

TATICEK, R. A. *et al.* Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. **Biotechnol. Progr.**, v. 17, n. 4, p. 676-84, 2001.

THARMALINGAM, T. *et al.* Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. **Mol. Biotechnol.**, v. 39, n. 2, p. 167-177, 2008.

TONSO, A. **Monitoramento e operação de cultivos de células animais em sistemas de perfusão**. 2000. 126 f. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TONSO, A. *et al.* Bioprocess development to produce rabies virus glycoprotein in bioreactor using insect S2 cells. **New Biotechnol.**, v. 25, n. p. S244-S244, 2009.

TOOVEY, S. Preventing rabies with the Verorab® vaccine: 1985-2005: twenty years of clinical experience. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 5, n. 6, p. 327-348, 2007.

TORFS, H. *et al.* Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable *Drosophila* Schneider 2 cell line. **J. Neurochem.**, v. 74, n. 5, p. 2182-2189, 2000.

TOTA, M. R. *et al.* Interaction of [fluorescein-Trp25]glucagon with the human glucagon receptor expressed in *Drosophila* Schneider 2 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 44, p. 26466-26472, 1995.

TRAMPER, J. *et al.* Shear sensitivity of insect cells in suspension. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 8, n. 1, p. 33-36, 1986.

VALLE, M. *et al.* Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. **Cytotechnology**, v. 35, n. 2, p. 127-135, 2001.

VALLEZ-CHETREANU, F. *et al.* An on-line method for the reduction of fouling of spin-filters for animal cell perfusion cultures. **J. Biotechnol.**, v. 130, n. 3, p. 265-273, 2007.

VAUGHN, J.; FAN, F. Differential requirements of two insect cell lines for growth in serum-free medium. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.**, v. 33, n. 6, p. 479-482, 1997.

VENTINI, D. C. *et al.* Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter. **J. Biotechnol.**, v. 146, n. 4, p. 169-172, 2010.

VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, A. J. T. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **J. Immunol. Methods.**, v. 216, n. 1-2, p. 165-181, 1998.

VIEIRA, P. B. **Cultura de células de *Drosophila melanogaster* (S2) em processo contínuo**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. Growth kinetics of cell cultures. In: **Bioreaction engineering principles**. 3rd ed. New York: Springer US, 2011. cap. 7, p. 271-357.

VOISARD, D. *et al.* Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 82, n. 7, p. 751-765, 2003.

VRIEZEN, N. *et al.* Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 54, n. 3, p. 272-86, 1997.

VRIEZEN, N.; VAN DIJKEN, J. P. Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 59, n. 1, p. 28-39, 1998.

WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. **Lancet**, v. 363, n. 9413, p. 959-969, 2004.

WOODSIDE, S. M.; BOWEN, B. D.; PIRET, J. M. Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors. **Cytotechnology**, v. 28, n. 1-3, p. 163-175, 1998.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, n. 11, p. 1393-1398, 2004.

YABANNAVAR, V. M.; SINGH, V.; CONNELLY, N. V. Mammalian cell retention in a spinfilter perfusion bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 40, n. 8, p. 925-933, 1992.

_____. Scaleup of spinfilter perfusion bioreactor for mammalian cell retention. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, n. 2, p. 159-64, 1994.

YIN, J. *et al.* Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **J. Biotechnol.**, v. 127, n. 3, p. 335-347, 2007.

YOKOMIZO, A. Y. *et al.* Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnol. J.**, v. 2, n. 1, p. 102-109, 2007.

ZHANG, Y. Approaches to optimizing animal cell culture process: substrate metabolism regulation and protein expression improvement. In: ZHONG, J. J.; BAI, F. W.; ZHANG, W. **Biotechnology in China I: from bioreaction to bioseparation and bioremediation**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2009. v. 113, p. 177-215.

ZHANG, Z.; AL-RUBEAI, M.; THOMAS, C. R. Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 14, n. 12, p. 980-983, 1992.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 5, p. 1158-1170, 2012.