CÁSSIA MARIA RAMACIOTTI DE ANDRADE

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FATOR VIII RECOMBINANTE EM BIORREATOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

São Paulo 2013

CÁSSIA MARIA RAMACIOTTI DE ANDRADE

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FATOR VIII RECOMBINANTE EM BIORREATOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth de Fatima Pires Augusto

Versão original

São Paulo 2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Andrade, Cássia Maria Ramaciotti de.

Desenvolvimento de processo de produção de fator VIII recombinante em biorreator / Cássia Maria Ramaciotti de Andrade. --São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Elisabeth de Fátima Pires Augusto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Cultivo de células animais.

Versão do título para o inglês: Development of a process for recombinant factor VIII production in bioreactor.

1. Biorreator 2. Células humanas 3. Proteína recombinante 4. Fator de coagulação VIII 5. Metabolismo 6. Microcarregador I. Augusto, Profa. Dra. Elisabeth de Fátima Pires II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB093/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):	Cássia Maria Ramaciotti de Andrade.
Título da Tese:	Desenvolvimento de processo de produção de fator VIII recombinante em biorreator.
Orientador(a):	Profa. Dra. Elisabeth de Fátima Pires Augusto.

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:

Aos meus pais, Silvio e Maria Inês, que com seu amor, iluminam o caminho da minha vida.

Ao Marcelo, meu amor.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Elisabeth Augusto pela oportunidade de realização do doutorado;

Ao MSc. Marcelo Antonio Aguiar, cuja ajuda (direta e indireta) foi tamanha, que eu nem sei por onde começar a agradecer. Mas mais do que tudo, obrigada por fazer parte da minha vida;

Ao Renato J. Andrade, por toda ajuda e amizade durante esses anos;

À pesquisadora Rita Alli e às Dras. Rosane Picolli e Patrícia Léo pelas discussões, apoio e amizade durante esses anos;

Aos técnicos do IPT - Valter, Régis e Antônio, por toda amizade e ajuda;

Aos auxiliares Bete Mariano, Oliveira e Saturnino pelo carinho;

Aos pesquisadores do IPT - Alfredo, Elda, Rosa, Filomena e, em especial, ao Thomaz;

Aos colegas do IPT - Cris, Fabiula, Rose, Gabi, Carol, Cláudia e Sérgio, pelos bons momentos;

Ao IPT, por fornecer toda a infraestrutura necessária para o andamento do projeto;

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto pela parceria;

Ao CNPq e à Finep pelo suporte financeiro.

E, de modo indireto, mas indispensável para a concretização deste trabalho:

Aos meios pais, Silvio e Maria Inês e aos meus irmãos, Júnior, Marcela e Bruno, por todo o amor, apoio e incentivo. Vocês são tudo para mim;

Ao Mamá: Tudo;

Às minhas afilhadas Nina e Sophia e ao meu afilhado Lucas, que está chegando;

À minha grande amiga e comadre Jú por toda amizade e por manter minha sanidade nos momentos difíceis do projeto;

À Mirian, Neide, Paulo, Marília e Kalinina pela amizade, apoio e ajuda durante esses anos;

Às amigas Wendy e Mariana pela amizade e pelos bons momentos;

Às minhas amigas e companheiras de congressos Dani e Mari.

Lucius Annaeus Seneca

Não é porque certas coisas são difíceis, que nós não ousamos. É justamente porque não ousamos, que tais coisas são difíceis.

RESUMO

ANDRADE, C. M. R. **Desenvolvimento de processo de produção de fator VIII recombinante em biorreator.** 2013. 319 p. Tese [Doutorado em Biotecnologia] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A deficiência de atividade do fator VIII (FVIII) de coagulação associa-se a uma doenca crônica, hemofilia A, cujo controle depende da reposição desta proteína na corrente sanguínea. Atualmente, no Brasil, todo o FVIII utilizado é importado e originário de plasma sanguíneo. No entanto, o FVIII recombinante (rFVIII) é uma alternativa mais segura, apresentando menor risco de contaminantes. Visando obter atividade adequada e evitar reações imunológicas, é desejável que o rFVIII seja produzido em sistemas capazes de realizar modificações pós-traducionais semelhantes àquelas encontradas na proteína normal. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um processo de produção de rFVIII em biorreator de bancada, bubble-free, utilizando duas linhagens humanas transfectadas pelo Hemocentro de Ribeirão Preto - rHeLa e rSKHep. Quando cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), estas linhagens apresentaram comportamentos semelhantes com relação ao crescimento e metabolismo celular. Ambas apresentaram crescimento celular (ΔX) médio de 1,47x10⁶ cel/mL (CV=4%) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) de 0,0284 h⁻¹ (CV=2%). Os valores de $Y_{X/GLC}$ e $Y_{LAC/GLC}$ também foram próximos, apresentando valores médios de 3,65x10⁸ cel/g (CV=14%) e 0,734 g/g (CV=2%), respectivamente. A principal diferença observada foi para $Y_{NH4/X}$, cujo valor obtido com a rHeLa foi 4,15 vezes maior que com a rSKHep. A linhagem rHeLa foi facilmente adaptada ao cultivo em suspensão e a meios livres de SFB, livres de componentes de origem animal e quimicamente definidos. Com esta linhagem foram desenvolvidos estudos preliminares para avaliar as condições mais favoráveis ao crescimento e metabolismo celular. Entretanto, técnicas analíticas implantadas durante o projeto mostraram que a rHeLa perdeu a capacidade de expressar o rFVIII. As tentativas de adaptação da rSKHep ao cultivo em suspensão e meios livres de SFB não foram bem sucedidas, de forma que adotou-se o cultivo com microcarregadores (mic). Os estudos que identificaram as melhores condições para operação neste sistema (3 g mic/L e 3 cel/mic) foram conduzidos a partir de resultados previamente obtidos com a rHeLa. Estudos de estabilidade da proteína mostraram altos índices de degradação (65%) quando exposta a 37 °C por 48 horas. Assim, optou-se pelo cultivo em modo perfusão, utilizando um *spinfilter* interno, como alternativa para produzir continuamente uma proteína cuja atividade seria pouco afetada devido ao baixo tempo de exposição à altas temperaturas. O cultivo em perfusão foi iniciado com 3 cel/mic e foi utilizada uma concentração de 3 gmic/L. O modo perfusão foi iniciado antes da interrupção da fase exponencial de crescimento, com tempo de residência hidráulico de 24 horas e alimentações independentes de glicose e glutamina, visando manter as concentrações destes substratos em 1 e 0,35 g/L, respectivamente. As variáveis controladas (concentração celular, glicose e glutamina) foram mantidas constantes durante três tempos de residência. A concentração de rFVIII máxima obtida foi semelhante à do ensaio em batelada, no entanto, a quantidade total produzida no ensaio em perfusão (16156,27 UI) foi 5,5 vezes superior à obtida na batelada, resultando em uma produtividade 2,5 vezes maior.

Palavras-chave: Biorreator. Células humanas. Proteína recombinante. Fator de coagulação VIII. Metabolismo. Microcarregador.

ABSTRACT

ANDRADE, C. M. R. **Development of a process for recombinant factor VIII production in bioreactor.** 2013. 319 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The deficiency of activity of the coagulation fator VIII (FVIII) is associated to a cronical disease, heamophilia A, which is controlled by the reposition of this protein in the blood. Nowadays, in Brazil, all the factor VIII consumed is produced abroad and has blood plasma origin. However, the recombinant factor VIII (rFVIII) is a safer regarding contamination risks. Aiming to obtain the proper activity and to avoid immunogenic reactions, it is desirable to produce a rFVIII in post-translation modifications similar to those observed at the normal protein. The objective of this work was to establish a process for rFVIII production in a bench bioreactor, bubble-free, using two human cell lines transfected by Hemocentro de Ribeirão Preto – rHeLa e rSKHep. When cultured in DMEM medium with 10% of fetal bovine serum (FBS), these cell lines showed similar behaviors regarding cell growth and metabolism. Both had an average cell production (ΔX) of 1,47x10⁶ cells/mL (CV=4%) and average specific cell growth rate ($\mu_{X,MAX}$) of 0,0284 h⁻¹ (CV=2%). Results for $Y_{X/GLC}$ and $Y_{LAC/GLC}$ were also similar, with average values of 3,65x10⁸ cell/g (CV=14%) and 0,734 g/g (CV=2%), respectively. The main difference was observed in the $Y_{NH4/X}$ value that was 4,15 times higher in the rHeLa cell line than in SKHep. The rHeLa cells were easily adapted to suspension and to serum-free, animal-component-free and chemically defined media. Preliminary studies to evaluate the best conditions to cell growth and metabolism were developed using this cell line. were developed. However, analytical techniques implemented during the project showed that rHeLa cells had lost its ability to produce the rFVIII. The rSKHep cell line couldn't be successfully adapted to suspension growth or to serum free media, so it was necessary to adopt microcarrier (mic). The studies to idenitify the best conditions for the culture system (3 gmic/L and 3 cells/mic) were performed using previous results from the rHeLa studies. Studies of rFVIII stability showed that it degradates 65% when exposed to 37 °C for 48 hours. Therefore, the perfusion mode, with and internal spinfilter, was an alternative to produce continuously a protein which activity wouldn't be seriously affected due to its low exposure time to high temperatures. The culture in perfusion mode was started with 3 cells/mic and it was used 3 g mic/L. The perfusion mode started before the interruption of the exponential growth phase, with a hydraulic residence time of 24 hours and independent glucose and glutamine feeds aiming to maintain the concentrations of these substrates at 1 and 0,35 g/L, respectively. The controlled variables (cell concentration, glucose and glutamine) were kept constant for three hydraulic residence times. The maximum rFVIII concentration obtained was similar to the one from the batch culture. However, the total amount of rFVIII produced at the perfusion mode (16,156.27 UI) was 5,5 times higher than in batch mode, resulting in a productivity of 2,5 times higher.

Keywords: Bioreactor. Human cells. Recombinant protein. Coagulation fator VIII. Metabolism. Microcarrier.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Principais biofármacos vendidos mundialmente em 2007
Tabela 3.2 - Comparação entre os principais sistemas de expressão de biofármacos: bactérias
(<i>E. coli</i>), leveduras, células de insetos e células de mamíferos
Tabela 3.3 - Microcarregadores disponíveis comercialmente
Tabela 4.1 - Quadro de ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento e do
metabolismo básico da linhagem rHeLa no Meio 1a89
Tabela 4.2 - Volumes de meio com SFB e isento de SFB no processo de adaptação
celular91
Tabela 4.3 - Ensaios realizados para estudos cinéticos preliminares do crescimento e do
metabolismo básico e da linhagem rHeLa em <i>Spinner</i> , em meios isento de soro93
Tabela 4.4 - Quadro completo de ensaios em biorreator com a linhagem rHeLaHyCD96
Tabela 4.5 - Planejamento experimental realizado com o auxílio do Software Design
<i>Expert</i> 102
Tabela 4.6 - Ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento, do metabolismo básico
e da produção de rFVIII da linhagem rSKHep103
Tabela 4.7 - Ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento, do metabolismo básico
e da produção de rFVIII da linhagem rSKHep105
Tabela 5.1 - Sítios de integração do vetor retroviral pFMG-FVIII-p140K na suposta linhagem
HepG2FVIIIDBP140K122
Tabela 5.2 - Valores das variáveis de estado dos ensaios realizados, nos instantes críticos do
processo (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} –
início da morte celular; ND – não disponível), em frasco T127
Tabela 5.3 - Valores das grandezas cinéticas dos ensaios realizados, em frasco T, calculados
na fase exponencial de crescimento128
Tabela 5.4 - Valores das variáveis de estado de todos os ensaios realizados, nos instantes
críticos do processo (t _{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t _{FIM} – fim de
crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível), em
Spinner
Tabela 5.5 - Valores das grandezas cinéticas de todos os ensaios realizados em Spinner,
calculados na fase exponencial de crescimento136

Tabela 5.6 - Quadro resumo das adaptações a meios de cultura isentos de SFB da linhagem
rHeLa, em frascos Spinner
Tabela 5.7 - Composição de aminoácidos dos meios empregados neste estudo e a alteração na
concentração de cada item em relação ao Meio 1a, obtidas a partir de análises realizadas no
laboratório do IPT141
Tabela 5.8 - Produtividades máximas alcançadas nos cultivos em meios com SFB e isentos
de SFB com a linhagem rHeLa e suas subpopulações142
Tabela 5.9 - Concentração de rFVIII em diferentes condições de cultivo com a linhagem
rHeLa, nos Meios 1a, 4, 6a e 9153
Tabela 5.10 - Valores das médias, DP e CV das variáveis de estado e das grandezas cinéticas
na fase exponencial de crescimento dos ensaios referências (Ensaios 13, 23 e 28, Tabelas 4.3,
5.4 e 5.5) com a linhagem rHeLaHyCDSp, em Spinner. (As Figuras isoladas de cada ensaio
encontram-se no APÊNDICE A)156
Tabela 5.11 - Concentração, consumo (em preto) e produção (em vermelho) de aminoácidos
em instantes críticos do cultivo: final do crescimento exponencial (t_{EXP}) e final de crescimento
celular (t _{FIM}) do Ensaio 28 (Tabela 4.3)158
Tabela 5.12 - Valores das variáveis de estado de todos os ensaios realizados, nos instantes
críticos do processo (t_{EXP} - final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} - fim de
crescimento; t _{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível)169
Tabela 5.13 - Valores das grandezas cinéticas de todos os ensaios realizados, calculadas na
fase de crescimento exponencial170
Tabela 5.14 - Influência da eficiência de plaqueamento em variáveis do cultivo207
Tabela 5.15 - Eficiência de plaqueamento das células SKHep
Tabela 5.16 - Valores das variáveis dos ensaios realizados em Spinner com a linhagem
rSKHep no Meio 1a (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de
crescimento; t _{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível)213
Tabela 5.17 - Valores das grandezas cinéticas de todos os ensaios realizados em Spinner com
a linhagem rSKHep no Meio 1a214
Tabela 5.18 - Concentração, consumo (em preto) e produção (em vermelho) de aminoácidos
em instantes críticos do cultivo: final do crescimento exponencial (t_{EXP}) e final de crescimento
celular (t _{FIM}) do Ensaio 73 (Tabela 4.7)
Tabela B.1 - Valores das variáveis de estado nos instantes críticos do processo
Tabela B.2 - Valores das grandezas cinéticas

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Comparação entre o número de proteínas terapêuticas pesquisadas globalmente
entre 2010 e 2012 e sua finalidades
Figura 3.2 - Concentração global das empresas de produção de biofármacos e vacinas38
Figura 3.3 - Via da N-Glicosilação. Man- Manose, GlnNAc – N-Acetil-Glucosamina, Gal –
Galactose, Fuc – Fucose, NeuAc – Ácido siálico (ou Ácido N-Acetil-Neuramínico)42
Figura 3.4 - Biorreatores descartáveis. 52
Figura 3.5 - Sistemas de cultivos de células aderentes
Figura 3.6 - Imagens microscópicas mostrando efeitos de adesão celular na superfície de
bolhas em cultivo com e sem Pluronic F6858
Figura 3.7 - Representação dos modelos de fluxo radial e axial obtido por impelidores em
biorreatores para cultivo de células animais59
Figura 3.8 - Exemplos de impelidores comumente utilizados em cultivos com células
animais
Figura 3.9 - Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato
Figura 3.10 - Esquema do metabolismo de glutamina vinculado ao ciclo de Krebs65
Figura 3.11 - Alteração do pH intracelular devido à formação de amônia67
Figura 3.12 - Fluxos de entrada e saída de aminoácidos no ciclo de Krebs em células de
mamíferos69
Figura 3.13 - Esquema de ruptura da parede vascular e formação do coágulo70
Figura 3.14 - Modelo de "cascata de coagulação" proposto por Macfarlane, Davie e
Ratnoff71
Figura 3.15 - Novo modelo da teoria da coagulação, baseada em superfícies celulares73
Figura 3.16 - Representação esquemática do heterodímero do FVIII74
Figura 3.17 - Representação esquemática do FVIIIa75
Figura 3.18 - Esquema da atuação da chaperona no retículo endoplasmático78
Figura 4.1 - Esquema do ensaio operado em perfusão com <i>spinfilter</i> externo
Figura 4.2 - Esquema do experimento Tempo de Mistura100
Figura 4.3 - Esquema para o estudo de retenção com o spinfilter externo
(Sartorius)101
Figura 4.4 - Esquema do ensaio operado em perfusão com <i>spinfilter</i> interno107

Figura 4.5 - Esquema para determinação das vazões das correntes de entrada de saída do
biorreator114
Figura 5.1 - Frequência de integração do vetor retroviral pMFG-FVIII-p140K em sítios
frágeis do genoma da suposta linhagem HepG2FVIIIDBP140K123
Figura 5.2 - Resultados do Ensaio 1 (Tabela 4.1), alisados através do método spline.
Linhagem rHeLa, Meio 1a, em frascos T125
Figura 5.3 - Influência do pH inicial da cultura sobre o crescimento celular (Ensaios 2 a 6,
Tabela 4.1). Resultados alisados através do método spline. Linhagem rHeLa, Meio 1a, em
frascos T128
Figura 5.4 - Influência da osmolalidade do meio de cultura sobre o crescimento celular
(Ensaios 4, 7 e 8, Tabela 4.1). Resultados alisados através do método spline. Linhagem
rHeLa, Meio 1a, em frascos T129
Figura 5.5 - Adaptação da linhagem celular rHela ao cultivo em suspensão, em frasco
Spinner, com o Meio 1a
Figura 5.6 - Resultados do Ensaio 10 (Tabela 4.1), alisados através do método spline.
Linhagem rHeLaDMEMSp, Meio 1a, em frascos T131
Figura 5.7 - Adaptação da linhagem rHela ao Meio 6a, isento de soro em frasco
Spinner
Figura 5.8 - Resultados alisados através do método spline, das cinéticas de crescimento das
subpopulações da linhagem rHeLa (rHeLaHySFSp, rHeLaHyCDSp e rHeLaHySiACFSp), em
diferentes meios de cultura isentos de SFB (HySF: Ensaio 11; Si-ACF: Ensaios 12 e 15;
HyCD_a: Ensaio 13, Tabela 4.3), respectivamente. Comparados com a condição de referência
da linhagem rHeLa (DMEM10%_a: Ensaio 10, Tabela 4.1) em frasco Spinner140
Figura 5.9 - Resultados alisados através do método spline, das cinéticas de crescimento da
linhagem rHelaHyCDSp, com diferentes concentrações iniciais de célula (2,0x10 ⁵ cel/mL e
1,3x10 ⁵ cel/mL, Ensaios 13 e 14, Tabela 4.3, respectivamente), com o Meio 6a, em
Spinner
Figura 5.10 - Resultados alisados através do método spline do estudo da influência do
volume de meio inicial sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 15 e 22 (140 e 250 mL,
respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em
Spinner145

Figura 5.11 - Resultados alisados através do método *spline* do estudo da influência do volume de meio inicial sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 23, 26 e 27 (140, 120 e

250 mL, respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em
Spinner146
Figura 5.12 - Variação de osmolalidade durante os cultivos com a linhagem rHeLaSiACFSp,
para diferentes osmolalidades iniciais, com o Meio 4, em Spinner147
Figura 5.13 - Efeito da osmolalidade sobre grandezas cinéticas normalizadas em relação aos
seus valores máximos em meios com SFB (Meio 1a) e isentos de SFB (Meios 4 e
6a)149
Figura 5.14 - Resultados alisados através do método spline do estudo da adição de pluronic
F68 sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 23 a 25 (sem adição de pluronic, com 0,1%
(p/v) de adição e com 0,2% (p/v) de adição, respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem
rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em <i>Spinner</i> 154
Figura 5.15 - Resultados alisados, através do método spline de um ensaio típico de referência
(Ensaio 28, Tabelas 4.3, 5.4 e 5.5) com a linhagem rHeLaHyCD, com Meio 6a157
Figura 5.16 - Resultados alisados através do método spline do estudo da adição de
suplementos sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 45 a 47 (sem adição de suplementos,
com 1g/L de albumina, com 1g/L de aprotinina e com 1g/L de albumina e aprotinina de
adição, respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em
Spinner161
Figura 5.17 - Conjunto de ensaios controle em Spinner, para os Ensaios 51 a 59 (BiF8_10,
BiF8_11, BiF8_12, BiF8_13, BiF8_14, BiF8_15, BiF8_17, BiF8_18 e BiF8_19,
respectivamente), realizados em biorreator
Figura 5.18 - Resultados do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisados através do método spline.
Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com 30% de oxigênio dissolvido164
Figura 5.19 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas
através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição
de 30% de oxigênio dissolvido165
Figura 5.20 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas
através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição
de 30% de oxigênio dissolvido166
Figura 5.21 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas
através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição
de 30% de oxigênio dissolvido167

Figura 5.22 - Variáveis de estado do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio Figura 5.23 - Resultados alisados através do método spline dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator......175 Figura 5.24 - Variáveis de estado dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator......176 Figura 5.25 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente, para avaliação do efeito do pO₂. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator......177 Figura 5.26 - Resultados alisados através do método spline dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com condições de GLN₀ de 700, 350, 1050 e 175 mg/L, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a ou 6b, em biorreator......179 Figura 5.27 - Variáveis de estado dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com condições de GLN₀ de 700, 350, 1050 e 175 mg/L, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a ou 6b, em biorreator......180 Figura 5.28 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com condições de GLN₀ de 700, 350, 1050 e 175 mg/L, respectivamente, para avaliação do efeito da concentração inicial de glutamina (GLN₀). Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a Figura 5.29 - Resultados alisados através do método spline dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com condições de GLC₀ de 8, 17, 4 e 2 g/L, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a ou 6b, em biorreator......185 Figura 5.30 - Variáveis de estado dos ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), em biorreator, com condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente......187 Figura 5.31 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com condições de GLC₀ de 8, 17, 4 e 2 g/L, respectivamente, para avaliação do efeito da concentração inicial de glicose. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a ou 6b, em

Figura 5.32 - Influência da posição de adição do traçador sobre o Tempo de Mistura191
Figura 5.33 - Influência do tipo de impelidor sobre o Tempo de Mistura, volume de 1,5 L,
adição do traçador em superfície192
Figura 5.34 - Influência do volume do biorreator sobre o Tempo de Mistura, com adição do
traçador em superfície192
Figura 5.35 - Influência do número de impelidores sobre o Tempo de Mistura, Volume de
1,5 L, com adição do traçador em superfície193
Figura 5.36 - Influência da distância entre impelidores sobre o Tempo de Mistura193
Figura 5.37 - Influência da agitação no tempo de mistura com diferentes
impelidores195
Figura 5.38 - Cinéticas de crescimento em biorreator, com a linhagem rHeLaHyCDSp, Meio
6a, com os impelidores 2-pitched blade e 3-blade segment-45°196
Figura 5.39 - Superfícies de resposta obtidas do software Design-Expert para as rotações de:
(a) 150 rpm; e (b) 400 rpm
Figura 5.40 - Resultados da simulação do software Design-Expert
Figura 5.41 - Resultados do Ensaio 61 (Tabela 4.6), alisados através do método spline.
Linhagem rSKHep, Meio 1a, em frascos T203
Figura 5.42 - Adaptação da linhagem rSkHep ao cultivo em meio isento de soro (Meio 6a)
em frasco Spinner
Figura 5.43 - Resultados dos ensaios com 1, 3, 5 e 8 células por microcarregador (Ensaios 63
a 66, respectivamente, Tabela 4.6) com a linhagem rSKHep no Meio 1a209
Figura 5.44 - Efeito do n° de células por microcarregador (X_{Mic}) sobre grandezas cinéticas
com a linhagem rSKHep no Meio 1a211
Figura 5.45 - Resultados dos ensaios com variação de concentração de microcarregadores (3,
6, 9 e 15 gmic/L) (Ensaios 67 a 70, Tabela 4.6)216
Figura 5.46 - Efeito da concentração de microcarregadores sobre grandezas as cinéticas com
a linhagem rSKHep no Meio 1a217
Figura 5.47 - Resultados alisados através do método spline do Ensaio 72 (Tabela 4.7), com
9 gmic/L e 3 cel/mic, com a linhagem rSKHep no Meio 1a219
Figura 5.48 - Resultados alisados através do método spline do Ensaio 73 (Tabela 4.7), com
3 gmic/L e 3 cel/mic, com a linhagem rSKHep no Meio 1a220
Figura 5.49 - Comparação entre os ensaios com 5 e 10% de SFB (Ensaios 74 e 73, Tabela
4.7, respectivamente) com a linhagem rSKHep

Figura 5.50 - Estudo da degradação de rFVIII
Figura 5.51 - Esquema do experimento em perfusão225
Figura 5.52 - Esquema do experimento em perfusão226
Figura 5.53 - Gráfico utilizado para o cálculo do coeficiente de manutenção celular de glicose
na condição com 3 gmic/L e meio com 10% de SFB em biorreator (Ensaio 73, Tabela
4.7)
Figura 5.54 - Resultados do ensaio em perfusão com a linhagem rSKHep no Meio 1c231
Figura 5.55 - Microcarregadores com células do Ensaio 75
Figura 5.56 - Esquema do ensaio em perfusão235
Figura A.1 - Resultados do Ensaio 2 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a,
em frasco T257
Figura A.2 - Resultados do Ensaio 3 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a,
em frasco T
Figura A.3 - Resultados do Ensaio 4 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a,
em frasco T
Figura A.4 - Resultados do Ensaio 5 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a,
em frasco T
Figura A.5 - Resultados do Ensaio 6 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a,
em frasco T
Figura A.6 - Resultados do Ensaio 7 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a,
em frasco T
Figura A.7 - Resultados do Ensaio 8 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a,
em frasco T
Figura A.8 - Resultado do crescimento celular (Xv) e viabilidade celular (Viab.) do Ensaio 9
(Tabela 4.1), com a linhagem rHeLaDMEMSp, Meio 1a260
Figura A.9 - Resultados do Ensaio 11 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHySFSp, com o
Meio 9, em Spinner
Figura A.10 - Resultados do Ensaio 12 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.11 - Resultados do Ensaio 13 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.12 - Resultados do Ensaio 14 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner

Figura A.13 - Resultados do Ensaio 15 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.14 - Resultados do Ensaio 16 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.15 - Resultados do Ensaio 17 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.16 - Resultados do Ensaio 18 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.17 - Resultados do Ensaio 19 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.18 - Resultados do Ensaio 20 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.19 - Resultados do Ensaio 21 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.20 - Resultados do Ensaio 22 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o
Meio 4, em Spinner
Figura A.21 - Resultados do Ensaio 23 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.22 - Resultados do Ensaio 24 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.23 - Resultados do Ensaio 25 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.24 - Resultados do Ensaio 26 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.25 - Resultados do Ensaio 27 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.26 - Resultados do Ensaio 29 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.27 - Resultados do Ensaio 30 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em <i>Spinner</i>
Figura A.28 - Resultados do Ensaio 31 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em <i>Spinner</i>

Figura A.29 - Resultados do Ensaio 32 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.30 - Resultados do Ensaio 33 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.31 - Resultados do Ensaio 34 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.32 - Resultados do Ensaio 35 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.33 - Resultados do Ensaio 36 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.34 - Resultados do Ensaio 37 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.35 - Resultados do Ensaio 38 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.36 - Resultados do Ensaio 39 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.37 - Resultados do Ensaio 40 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.38 - Resultados do Ensaio 41 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.39 - Resultados do Ensaio 42 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.40 - Resultados do Ensaio 43 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.41 - Resultados do Ensaio 44 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.42 - Resultados do Ensaio 45 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em Spinner
Figura A.43 - Resultados do Ensaio 46 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em <i>Spinner</i> 277
Figura A.44 - Resultados do Ensaio 47 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em <i>Spinner</i>

Figura A.45 - Resultados do Ensaio 48 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em <i>Spinner</i>
Figura A.46 - Resultados do Ensaio 51 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em biorreator279
Figura A.47 - Resultados do Ensaio 52 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em biorreator
Figura A.48 - Resultados do Ensaio 53 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em biorreator
Figura A.49 - Resultados do Ensaio 54 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6b, em biorreator
Figura A.50 - Resultados do Ensaio 55 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em biorreator
Figura A.51 - Resultados do Ensaio 56 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6b, em biorreator
Figura A.52 - Resultados do Ensaio 57 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6a, em biorreator
Figura A.53 - Resultados do Ensaio 58 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6b, em biorreator
Figura A.54 - Resultados do Ensaio 59 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o
Meio 6b, em biorreator
Figura B.1 - Resultados do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisados através do método spline.
Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com 30% de oxigênio dissolvido285
Figura B.2 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50, alisadas através do
método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de
oxigênio dissolvido
Figura B.3 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50, alisadas através do
método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de
oxigênio dissolvido
Figura B.4 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50, alisadas através do
método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de
oxigênio dissolvido

Figura B.5 - Variáveis de estado do Ensaio 50, alisadas através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio Figura B.6 - Resultados alisados através do método spline dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Linhagem Figura B.7 - Variáveis de estado dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em Figura B.8 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente, para Figura B.9 - Resultados alisados através do método spline dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com as condições de 700, 350, 1050 e 175 mg/L de GLN₀, respectivamente. Figura B.10 - Variáveis de estado dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com as condições de 700, 350, 1050 e 175 mg/L de GLN₀, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em Figura B.11 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com as condições de 700, 350, 1050 e 175 mg/L de GLN₀, respectivamente, para avaliação do efeito da GLN_0 . Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a. em Figura B.12 - Resultados alisados através do método spline dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com as condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente. Linhagem Figura B.13 - Variáveis de estado dos Ensaios Ensaios 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com as condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em

Figura B.14 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 53, 57, 58 e 59
(Tabela 4.4), com as condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC ₀ , respectivamente, para avaliação
do efeito da GLC ₀ . Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator
Figura C.1 - Resultados do Ensaio 63 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.2 - Resultados do Ensaio 64 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.3 - Resultados do Ensaio 65 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.4 - Resultados do Ensaio 66 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.5 - Resultados do Ensaio 67 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.6 - Resultados do Ensaio 68 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.7 - Resultados do Ensaio 69 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.8 - Resultados do Ensaio 70 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner
Figura C.9 - Resultados do Ensaio 71 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a,
em Spinner

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACF Meio de cultura isento de componentes animais
- BHK Linhagem de células de rim de hamster bebê
- CD Meio de cultura quimicamente definido
- CHO Linhagem de células de ovário de hamster chinês
- C_{Mic} Concentração de microcarregador (g/L)
- C_{RE} Concentração de *beads* na corrente de retorno (beads/mL)
- C_R Concentração de *beads* na corrente de circulação (beads/mL)
- CV Coeficiente de variação (%)
- D Vazão específica de alimentação (d⁻¹) ou (h⁻¹)
- $D_{GLC,0}$ vazão específica de alimentação de glicose (h⁻¹)
- $D_{GLN,0}$ vazão específica de alimentação de glutamina (h⁻¹)
- $D_{M,0}$ vazão específica de alimentação de meio (h⁻¹)
- DMEM Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DP Desvio Padrão
- ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
- FCS Fetal Calf Serum -Soro fetal de bezerro
- GLC Concentração de glicose (g/L)
- GLN Concentração de glutamina (mg/L)
- HPLC Cromatografia líquida de alta pressão
- IC Índice de Confluência (%)
- LAC Concentração de lactato (g/L)
- Mic Microcarregador
- NH₄ Concentração de amônia (mg/L)
- PBS Solução-tampão de fosfato
- pH Potencial hidrogeniônico
- pO2 Concentração de oxigênio dissolvido (%)
- PLU Pluronic F68
- Q_R Vazão de recirculação (mL/min)
- Q_D Vazão de alimentação (mL/min)
- rHeLa Linhagem recombinante de células humanas originárias de um câncer cervical
- rFVIII Fator 8 recombinante

rSKHep - Linhagem recombinante de células humanas originárias de um câncer de fígado

- RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction
- SFB Serum Fetal Bovine -Soro fetal bovino
- SFM Meio de cultura livre de soro
- TTPa Tempo da tromboplastina parcialmente ativada
- Viab. Viabilidade celular (%)
- X_{MIC} Número de células viáveis por microcarregador (cel/mic)
- Xv Concentração de células viáveis (cel/mL)
- $Y_{X/GLC}$ Fator de conversão de glicose a célula (cel/g)
- Y_{X/GLN} Fator de conversão de glutamina a célula (cel/g)
- $Y_{LAC/GLC}$ Fator de conversão de glicose a lactato (g/g)
- $Y_{NH4/GLN}$ Fator de conversão de glutamina a amônio (g/g)
- $Y_{NH4/X}$ Fator de formação de amônio por unidade de célula (mg/10⁶ cel)
- $Y_{rFVIII/X}$ Fator de produção de rFVIII por unidade de célula(UI/10⁶ cel)

Símbolos gregos

- ΔX Crescimento celular (cel/mL)
- $\mu_{X,MAX}$ Velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹)
- μ_{GLC} Velocidade específica de consumo de glicose (g/cel.h)
- μ_{GLN} Velocidade específica de consumo de glutamina (g/cel.h)
- μ_{LAC} Velocidade específica de produção de lactato (g/cel.h)
- μ_{NH4} Velocidade específica de produção de amônio (g/cel.h)
- Π_X Produtividade em células (cel/h)
- Π_{P} Produtividade em produto (UI/h)
- ω rotação (rpm)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
2 OBJETIVOS	
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
3.1 Produção de biofármacos	
3.1.1 Histórico	
3.1.2 Sistemas de expressão de biofármacos	
3.1.2.1 Glicosilação de proteínas recombinantes	41
3.2 Meios de cultura	45
3.2.1 Adaptação celular	48
3.3 Biorreatores	49
3.3.1 Cultivos de células em suspensão	
3.3.2 Cultivo de células aderentes	
3.3.2.1 Microcarregadores	54
3.3.3 Transferência de oxigênio e cisalhamento	56
3.3.4 Modos de operação de biorreatores	
3.4 Metabolismo celular	
3.5 Fator de coagulação VIII	70
3.5.1 Coagulação sanguínea	70
3.5.2 Fator VIII – A estrutura da proteína	73
3.5.3 Hemofilia A	
3.5.4 Produção de fator VIII em células animais	77
4 MATERIAIS E MÉTODOS	82
4.1 Linhagens utilizadas	82
4.2 Meios de cultura	
4.2.1 Formulação básica (com SFB)	
4.2.1.1 Formulação aberta	83
4.2.1.2 Formulação fechada	
4.2.2 Formulações isentas de SFB	84
4.2.2.1 Meios livres de componentes animais	84
4.2.2.2 Meios quimicamente definidos.	
4.2.2.3 Meios isentos de soro	

4.3 Sistemas de cultivo	85
4.4 Preparo de Inóculo	87
4.5 Preparo de Microcarregadores	88
4.6 Descrição de Ensaios	89
4.6.1 Ensaios com a linhagem rHeLa	89
4.6.1.1 Estudos com meio de cultivo contendo SFB	
4.6.1.1.1 Estudos preliminares em frascos T e Spinner	89
4.6.1.1.2 Adaptação da linhagem ao crescimento em suspensão	90
4.6.1.2 Estudos com meio de cultivo isento de SFB	90
4.6.1.2.1 Adaptação da linhagem celular a meios isentos de SFB	91
4.6.1.2.2 Avaliação de cinéticas de crescimento em diferentes meios	93
4.6.1.2.3 Avaliação da influência de parâmetros sobre a cinética de crescimento	94
4.6.1.3 Estudos em biorreator	96
4.6.1.3.1 Ensaios operados em modo batelada	96
4.6.1.3.2 Ensaio operado em modo perfusão	97
4.6.2 Estudos preliminares para determinação de variáveis de operação	99
4.6.2.1 Estudos referentes à homogeneidade do sistema (Tempo de mistura)	99
4.6.2.2 Estudo da eficiência de retenção celular de um Spinfilter externo	100
4.6.3 Ensaios com a linhagem rSKHep	103
4.6.3.1 Estudos preliminares em frascos T	103
4.6.3.2 Medida da eficiência de plaqueamento da célula rSKHep	103
4.6.3.3 Estudos preliminares em frasco Spinner	104
4.6.3.3.1 Influência do número inicial de células por microcarregador	104
4.6.3.3.2 Influência da concentração de microcarregadores	104
4.6.3.4 Ensaios em biorreator	104
4.6.3.4.1 Ensaios operados em modo batelada	105
4.6.3.4.2 Ensaio operado em modo perfusão	105
4.6.4 Tratamento de amostras	
4.7 Métodos analíticos	109
4.7.1 Concentração celular	109
4.7.2 Viabilidade	109
4.7.3 Confluência celular em Frasco T	110
4.7.4 Confluência celular em Microcarregadores	110

4.7.5 Determinação da concentração de glicose	110
4.7.6 Determinação da concentração de lactato	111
4.7.7 Determinação da concentração de amônio	112
4.7.8 Determinação da concentração de aminoácidos	112
4.7.9 Determinação de vazões	113
4.7.10 Determinação dos volumes de ácido e base adicionados ao biorreator	114
4.7.11 Determinação do pH	115
4.7.12 Osmolalidade	115
4.7.13 Determinação da atividade de rFVIII	115
4.8 Tratamento de dados	116
4.8.1 Alisamento dos dados	116
4.8.2 Determinação das velocidades específicas	116
4.8.3 Tempo de geração	116
4.8.4 Fatores de conversão	117
4.8.5 Produtividades em células e produto	117
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
5.1 Estudos com a linhagem rHeLa	121
5.1.1 Estudos preliminares em frascos T e Spinner	124
5.1.1.1 Estudos com meio contendo SFB	124
5.1.1.1.1 Cinéticas de referência em frasco T	124
5.1.1.1.2 Estudo da influência do pH inicial em frascos T	128
5.1.1.1.3 Estudo da influência da osmolalidade inicial em frascos T	129
5.1.1.1.4 Adaptação da linhagem ao crescimento em suspensão	
5.1.1.2 Adaptação da linhagem celular a meios de cultura isentos de SFB	136
5.1.1.2.1 Cinéticas de crescimento em diferentes meios de cultivo isentos de soro	138
5.1.1.3 Estudos com meio de cultivo isento de SFB em frascos Spinner	142
5.1.1.3.1 Influência da concentração inicial de células (Meio 6a)	142
5.1.1.3.2 Influência do volume de meio no crescimento celular em meios isen	tos de SFB
(Meios 4 e 6a)	144
5.1.1.3.3 Influência da osmolalidade inicial nos meios de cultura com ou isentos de	e SFB147
5.1.1.3.4 Resultados de produção de rFVIII	152
5.1.1.3.5 Influência da adição de Pluronic F68 ao Meio 6a	
5.1.1.3.6 Influência da adição de aminoácido ao Meio 6a	155

5.1.1.3.7 Influência da adição de suplementos ao Meio 6a	160
5.1.2 Estudos cinéticos em biorreator operado em modo batelada	162
5.1.2.1 Controle da qualidade do inóculo	162
5.1.2.2 Avaliação da influência do oxigênio dissolvido (pO2)	163
5.1.2.3 Avaliação da influência da concentração inicial de glutamina (GLN ₀)	178
5.1.2.4 Avaliação da influência da concentração inicial de glicose (GLC ₀)	184
5.2 Ensaios preliminares para determinação de variáveis de operação	189
5.2.1 Estudos referentes à homogeneidade do sistema (Tempo de mistura)	189
5.2.1.1 Influência da Agitação	190
5.2.1.2 Influência da posição de adição do traçador	191
5.2.1.3 Influência do tipo de impelidor	192
5.2.1.4 Influência do volume útil	193
5.2.1.5 Influência do número de impelidores	194
5.2.1.6 Influência da distância entre os impelidores	194
5.2.1.7 <u>Comparação entre os θ_{M} dos impelidores 2-<i>pitched blade</i> e 3-<i>blade segment</i></u>	194
5.2.2 Estudo da eficiência de retenção celular de um Spinfilter externo	196
5.2.2.1 Ensaio realizado com a linhagem rHeLaHyCDSp, em biorreator opera	ido em
perfusão	200
5.3 Estudos com a linhagem rSKHep	202
5.3.1 Cinética em frasco T em meio com SFB	202
5.3.2 Adaptação ao crescimento em suspensão em meio isento de SFB	205
5.3.3 Estudos com microcarregadores	206
5.3.3.1 Eficiência de plaqueamento	206
5.3.3.2 Ensaios em frascos Spinner	208
5.3.3.2.1 Influência do número de células iniciais por microcarregador $(X_{MIC,0})$	208
5.3.3.2.2 Influência da concentração de microcarregadores	215
5.3.3.3 Ensaios em biorreator operado em modo batelada	218
5.3.3.4 Ensaio em biorreator operado em modo perfusão	223
6 CONCLUSÕES	236
REFERÊNCIAS	240
APÊNDICE A – ENSAIOS COM A LINHAGEM rHeLa	257
APÊNDICE B – ABORDAGEM ALTERNATIVA AOS ENSAIOS EM BIORRE	ATOR
COM A LINHAGEM rHeLa	284

APÊNDICE C – ENSAIOS COM A LINHAGEM rSKHep	311
--	-----

1 INTRODUÇÃO

O fator VIII de coagulação sanguínea (FVIII) é uma glicoproteína plasmática de alto peso molecular, estimado em 265 kDa, e que possui algumas características específicas como seu elevado tamanho e alta complexidade, quando comparada a outras proteínas.

A atividade desta proteína está diretamente relacionada às modificações póstraducionais. O fator VIII é uma proteína altamente ocupada por N- e O-glicanos sendo que, de 25 sítios consensos de N-glicosilação, 23 são ocupados. Além disso, apresenta sulfatação em resíduos de tirosina em cinco posições de sua estrutura (WHITE et al., 1998). A presença destas modificações contribuem para a complexidade desta proteína.

A sua função é atuar como um cofator essencial na ativação proteolítica do fator X pela ativação do fator IX, dentro da via de coagulação do sangue. A deficiência da atividade deste fator essencial está relacionada a uma doença hereditária, hemofilia A, ligada ao cromossomo X, que ocorre mundialmente em 1 a cada 5.000 a 10.000 nascimentos masculinos e está relacionada em 75 a 80% dos casos de hemofilia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), sendo necessária a reposição do mesmo para o seu controle.

O FVIII pode ser obtido diretamente através de derivados de plasma sanguíneo (pdFVIII) ou na forma de proteínas recombinantes (rFVIII) expressas por linhagens de murinos modificadas geneticamente (MIAO et al., 2004), sendo que este último está disponível apenas para 25% dos pacientes no mundo (STONEBRACKER et al., 2010).

No Brasil, há cerca de 10.000 hemofílicos e o tratamento é realizado com pdFVIII de indivíduos normais, produto 100% importado pelo governo (RESENDE; SILVA, 2009). Essa estratégia apresenta duas desvantagens. A primeira é o risco de transmissão de doenças, devido à transferência de produtos do plasma sanguíneo de um doador para a corrente sanguínea de um paciente. Nas décadas de 1970 e 1980, cerca de 60 a 70% de pacientes dos EUA e da Europa Ocidental foram contaminados por vírus causadores de doenças como HIV e hepatites B e C (SOUKHAREV et al., 2002). Desde então, a segurança e eficácia terapêutica destes produtos aumentaram significativamente, com a implementação de medidas mais rigorosas de seleção de doadores e métodos de *screening*, purificação monoclonal e introdução de novas técnicas de inativação viral. No entanto, estes métodos são considerados pouco efetivos em relação a transmissão do parvovírus B19, do vírus causador da hepatite A e ainda resta a dúvida, quanto à patógenos emergentes, como o causador da doença de Creutzfelt-Jakob (SOUKHAREV et al., 2002).

A segunda desvantagem está relacionada à grande quantidade de plasma sanguíneo normal necessário para atender os pacientes, que contam com a genorosidade de doadores. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2012), o aumento na expectativa de vida e o consequente crescimento de doenças crônicas relacionadas ao avanço da idade, exigem transfusões de sangue e uso de hemoderivados, que vão além da oferta existente. Cerca de 92 milhões de doações são feitas todos os anos no mundo, a maioria por voluntários. Entretanto, deste total, 30 milhões realizam o procedimento uma única vez e não retornam aos hemocentros para novas doações.

O Brasil importa cerca de 210 milhões de UI/ano de fator VIII, quando deveria importar cerca de 600 milhões de UI/ano. Portanto, no país, pacientes com Hemofilia A não recebem um tratamento preventivo, mas sim curativo, isto é, apenas quando sofrem algum tipo de trauma. Segundo o Ministério da Saúde brasileiro o custo deste tipo de tratamento é de 100 milhões de dólares anuais (ROSA et al., 2012).

Entre as opções de fontes de obtenção de fatores de coagulação sanguínea, as formas recombinantes tendem a substituir a produção tradicional dos fatores a partir do plasma humano (JIANG et al., 2002). Com o avanço tecnológico, a caracterização da maquinaria de expressão, tradução e secreção destas moléculas, assim como a geração de novos vetores, tem-se tornado viável o emprego de estratégias mais promissoras para a obtenção deste fator.

Em geral, a produção de proteínas recombinantes terapêuticas requer processos com alta densidade celular para obtenção de concentrações elevadas de produto, reduzindo a escala de produção e minimizando custos de recuperação/purificação das proteínas. A obtenção de altas densidades exige conhecimento profundo do metabolismo e das cinéticas de produção, a fim de reduzir efeitos limitantes e inibidores e garantir o potencial máximo das células, em termos de crescimento e expressão do produto.

Linhagens com elevada capacidade de expressão não garantem sozinhas um bom desempenho de produção. É necessário investir em engenharia de processo, principalmente para proteínas terapêuticas, tendo em vista as exigências regulatórias para aprovação. Robustez, reprodutibilidade e garantias quanto à qualidade, à pureza e à segurança são imprescindíveis. Do ponto de vista da indústria, a simplicidade e uma produtividade elevada, que minimize investimentos em equipamentos e áreas GMP, são desejáveis.

A complexidade do fator VIII acarreta em uma desvantagem crítica para o processo produtivo, que está relacionada à estabilidade da proteína. Quando em estado líquido, a proteína apresenta altas taxas de degradação e perda de atividade, as quais estão relacionadas a diversos fatores, tais como altas temperaturas, pH, presença de íons metálicos ou de sais (WANG; WANG; KELNER, 2003). Desta forma, o processo deve ser altamente controlado para minimizar o tempo no qual a proteína é exposta às condições adversas. Os processos são, em geral, operados em batelada alimentada ou em contínuo com reciclo (perfusão). Dada a labilidade do rFVIII, perda de 50% da atividade em 6-12h em condições de cultivo (KONSTANTINOV, 2008), a perfusão com alta taxa de alimentação e resfriamento imediato do produto é uma alternativa interessante para preservar sua atividade biológica (BHATTACHARYYA et al., 2003; KONSTANTINOV, 2008).

Outro fator importante está relacionado com as modificações pós-traducionais da proteína, segundo Pipe (2008), sua complexidade requer que ela seja produzida num sistema de expressão de células de mamíferos. Atualmente, os produtos de rFVIII disponíveis comercialmente utilizam células de murinos (CHO ou BHK) transfectadas utilizando vetores plasmidiais convencionais (SPENCER et al., 2011).

A utilização de células de murinos levanta questionamentos, pois estas linhagens não apresentam algumas glicosidases, glicosiltransferases e doadores específicos de açúcares, necessários para fazer a glicosilação da proteína com padrões semelhantes aos encontrados em humanos, o que pode resultar em reações imunes nos pacientes ou em menores tempos de meia-vida da proteína (SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2012). Desta forma, esforços têm sido direcionados no sentido de utilizar células humanas para a produção desta proteína (SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2012).

Este trabalho está inserido em um projeto Finep, com uma parceria entre a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT). O grande diferencial é a utilização de uma linhagem humana transfectada para produção de rFVIII, capaz de fazer todas as modificações pós-traducionais necessárias para a conformação correta da proteína. Outro fator importante é a utilização de vetores lentivirais, que apresentam maior eficiência do que vetores não-virais (NHISHIKAWA; HUANG, 2001) e são uma alternativa promissora, com a qual já foi possível obter altos níveis de expressão e de estabilidade *in vitro* de rFVIII em linhagens humanas de SkHep, em torno de 1,5 a 2,1 UI/10⁶ células em 24 horas (PICANÇO et al., 2007; ROSA et al., 2012; RUSSO-CARBOLANTE et al., 2011). Uma UI (Unidade Internacional) equivale a 100% de atividade da proteína, que é o valor observado em pessoas sadias.

Inicialmente, os estudos foram concentrados em uma linhagem de HepG2FVIIIDBP140K (rHepG2), enviada ao IPT. A quantificação de rFVIII expresso por

esta linhagem era realizada através da metodologia PTTa. Em 2010, quando métodos alternativos de quantificação da proteína foram implementados (Cromogênico e ELISA), foi detectado um problema de inconsistência entre os resultados destas três metodologias. Na busca de uma explicação, a equipe do Hemocentro de Ribeirão Preto realizou um estudo sobre a análise dos sítios de integração do FVIII-P140K da linhagem celular (rHepG2) utilizada até o momento e constatou, que a integração ocorreu com alta frequência em sítios frágeis (20%). Isso poderia explicar a perda do gene do FVIII na linhagem, após longos períodos de cultivo celular.

Para complementar este estudo foi realizado também, um Exame de Vínculo Genético (STR-*Fingerprint*), no qual verificou-se que a cultura rHepG2, na verdade era uma cultura de uma linhagem tumoral humana denominada HeLa. Após este resultado, pode-se concluir que a linhagem modificada geneticamente para expressar o rFVIII tratava-se de uma rHeLa.

A grande demora em identificar essa perda de expressão ocorreu devido ao fato das células sintetizarem alguma substância desconhecida capaz de promover a coagulação no teste TTPa, com resultados elevados e promissores.

Enquanto isso, foi enviado pelo Hemocentro de Ribeirão Preto uma nova linhagem humana SkHep-FVIIIGFP-CMVdelB (rSKHep), cuja produção de rFVIII pode ser quantificada tanto pelo método TTPa, quanto pelos métodos Cromogênico e ELISA. Além de toda caracterização da linhagem celular ter sido feita pelo Hemocentro, foi realizado no IPT um RT-PCR para verificar se, efetivamente, o gene de produção de rFVIII estava inserido no genoma desta célula e obteve-se resultado positivo.

Os experimentos com a linhagem humana rHeLa continuaram, devido ao fato destas células serem um importante modelo para estudos de câncer, por sua utilização no controle de qualidade de biofármacos, por servir como hospedeira para expressão de proteínas recombinantes e por ser utilizada na produção de vacinas (EL-ENSAHY et al., 2009). Além disso, pretendia-se correlacionar os resultados obtidos nos estudos com esta linhagem com os da linhagem rSKHep, visando implementar o processo de produção da proteína mais rapidamente.

Com a linhagem rSKHep foram realizados experimentos, que tinham por finalidade avaliar as condições que otimizavam o crescimento celular e a produção de rFVIII. Após a definição das condições mais adequadas e utilizando dados previamente obtidos nos estudos com rHeLa, passou-se à etapa de cultivo em perfusão, que era a principal meta do trabalho.

2 OBJETIVOS

O objetivo é desenvolver em escala de bancada, processo de produção para o fator recombinante de coagulação rFVIII, identificando biorreator e modo de operação adequados para esse fim.

Objetivos específicos:

- a) caracterizar o crescimento, o metabolismo das linhagens humanas rHeLa e rSKHep e a produção da linhagem rSKHep nas condições originais de cultivo: meio de cultivo contendo soro fetal bovino (SFB) e frasco tipo T;
- b) adaptar as linhagens celulares para cultivo em suspensão;
- c) adaptar as linhagens celulares a meios de cultivo isentos de SFB;
- d) avaliar as cinéticas de crescimento da linhagem rHeLa nestes meios de cultivo isentos de SFB em *Spinner* e em biorreator agitado isento de bolhas (*bubble free*);
- e) definir as condições de operação do *spinfilter* externo (sistema de retenção), maximizando a retenção celular;
- f) estabelecer as condições básicas para os cultivos das células rSkHep em Spinner com microcarregadores;
- g) caracterizar o crescimento, o metabolismo e a produção da linhagem rSKHep em biorreator agitado isento de bolhas, utilizando como suporte microcarregadores;
- h) estabelecer o processo de produção em biorreator operado em perfusão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de biofármacos

3.1.1 Histórico

Historicamente, a biotecnologia pode ser divida em três fases distintas. A primeira, relativa ao período que vai desde a antiguidade até o século XIX, está relacionada muito mais a "descobertas" advindas da observação da natureza do que a "desenvolvimentos". Considerase que o queijo, o pão e o vinho, todos produzidos pelos egípcios entre 2500 e 2000 a.C., foram os primeiros produtos biotecnológicos (DUPONT, 2013; VERMA et al., 2011).

A segunda fase da biotecnologia, denominada "clássica", engloba o período entre o início do século XIX até metade do século XX. Durante este período, houve diversas observações com evidências científicas, dentre as quais se podem citar algumas das mais relevantes, como o desenvolvimento do processo de pasteurização, por Louis Pasteur, em 1864; as observações de Gregor Mendel em 1865, dando início à genética moderna; as descobertas de Robert Brown e Friedrich Miescher, em 1868, que desencadearam o descobrimento do DNA e de seu papel na transferência de informações; a descoberta dos antibióticos e o consequente desenvolvimento da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1944 (CARRONDO, 2011; DUPONT, 2013; VERMA et al., 2011).

Por fim, a partir da metade do século XX, a biotecnologia moderna se inicia com o descobrimento da estrutura do DNA, em 1953, por James Watson e Francis Crick, dando início ao desenvolvimento da técnica de DNA recombinante (VERMA et al., 2011).

Em 1907, Ross G. Harrison foi o pioneiro na cultura de células ao estudar o crescimento de células do sistema nervoso de sapos (MASTERS, 2002). No entanto, as primeiras aplicações com cultivo de células animais só surgiram na década de 1950 visando a produção de vacinas, as quais eram tradicionalmente produzidas em gemas de ovos embrionários, mas devido ao aumento na demanda, foi necessário o desenvolvimento de técnicas alternativas. Em 1954, a primeira vacina contra poliomielite foi produzida em células primárias de rim de macaco. Produtos para aplicações médicas também começaram a ser produzidos em células animais, sendo que o primeiro foi o Interferon (IFN) alfa (OZTURK, 2006).

Outro marco da cultura de células foi o estabelecimento da primeira linhagem contínua de células cancerígenas, obtidas por George Otto Gey, em 1951, a partir de células de câncer cervical da paciente Henrietta Lacks cuja inicias deram origem ao nome da linhagem celular: HeLa (MASTERS, 2002).

A partir da segunda metade da década de 1980, linhagens de células contínuas, como BHK, CHO, células de mielona (SP2/0, NS0) e HEK começaram a ser gradualmente aceitas para produção de biofármacos. Atualmente, as células CHO são as mais utilizadas neste ramo, sendo que o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), produzido em 1987 pela Genentech foi o primeiro biofármaco aprovado produzido nesta linhagem. Neste mesmo ano, foi aprovado o primeiro anticorpo monoclonal produzido em células animais: o OKT3 para o tratamento de rejeição de transplantes (OZTURK, 2006). Desde então, células de mamíferos tornaram-se o sistema predominante de produção de proteínas recombinantes para aplicações clínicas (WURM, 2004). A tabela 3.1 mostra que, em 2007, 57% da receita obtida pela venda dos 19 biofármacos mais vendidos mundialmente, foram originários de produtos produzidos em células de mamíferos (ZHU, 2012).

Nos últimos anos, com término das patentes de diversos biofármacos, a produção de biossimilares tornou-se uma tendência. Os biossimilares são proteínas semelhantes àquelas já disponíveis no mercado, com atividade igual ou equivalente. A principal vantagem de um biossimiliar frente a um biofármaco inovador está relacionada às menores exigências quanto à realização de ensaios pré-clínicos e clínicos para aprovação do medicamento. Entre 2006 e 2010, aproximadamente 50% dos biofármacos aprovados pela Agência Européia de Medicamentos (EMA) foram biossimilares (WALSH, 2010).

Cada vez mais recursos vêm sendo investidos anualmente em pesquisa e desenvolvimento de biofármacos para as mais diversas aplicações. A figura 3.1 mostra o número de proteínas terapêuticas pesquisadas para diferentes finalidades. No entanto, apenas 10% destas proteínas, que entram em fase inicial de pesquisa, são lançadas no mercado (BIOPLAN ASSOCIATES, 2012). Apesar disso, entre 2011 e 2012, o mercado de biofármacos movimentou em torno de 145 bilhões de dólares e apresentou uma taxa de crescimento de 15% (BIOPLAN ASSOCIATES, 2012).

Em 2010, 58 biofármacos foram aprovados na Europa e Estados Unidos, dentre os quais 30 eram hormônios e fatores de crescimento, 13 eram produtos baseados em anticorpos monoclonais, 4 eram proteínas sanguíneas, 2 eram vacinas e 9 eram outros produtos, como proteínas de fusão e enzimas terapêuticas (WALSH, 2010).
Tem-se observado que este mercado vem crescendo em países do BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) e em outros países em desenvolvimento. Mesmo assim, a produção nestes países ainda é muito pequena quando comparada com os Estados Unidos e a Europa, onde estão localizadas as maiores empresas produtoras de biofármacos (BIOPLAN ASSOCIATES, 2012). A figura 3.2 mostra a distribuição global das empresas deste setor em janeiro de 2013.



Figura 3.1 - Comparação entre o número de proteínas terapêuticas pesquisadas globalmente entre 2010 e 2012 e sua finalidades. Fonte: BioPlan Associates (2012).

Produto	Receita Anual (Milhões de dólares)	Ano de aprovação no FDA	Empresa	Sistema de expressão	Indicação
Eritropoetina	10,794	1989	Amgen, Roche, J&J	Cel. Mamíferos	Anemia
Insulina	10,132	1982	Eli Lilly, Novo Nordisk, Sanofi-Aventis	E.coli	Diabetes
Interferons	7,455	1993	Schering-Plough, Roche, Biogen-Idec, Bayer-Schering, Merck-Serono	E. coli e leveduras	Infecção viral e câncer
Etanercept	5,275	1998	Amgen, Wyeth (Enbrel ®)	Cel. Mamíferos	Artrite reumatóide
Remicade	4,948	1998	J&J, Schering-Plugh	Cel. Mamíferos	Artrite reumatóide
Rituxan	4,600	1997	IDEC, Genentech, Roche	Cel. Mamíferos	NHL e CLL
Neupogen/Neulasta	4,277	1998/2002	Amgen	E.coli	Mielosupressivo
Fatores de coagulação	4,168	1996/1997 1993/2000 1992/2003 2000	Novo Nordisk, Wyeth - FVII, FIX Bayer (Kogenate® / Kogenate FS®) - FVIII Baxter(Recombinate® /Advate®) - FVIII CSL Behring (Helixate FS®) - FVIII	Cel. Mamíferos	Hemofilia
Trastuzumab	4,046	1998	Genentech e Roche (Herceptin®)	Cel. Mamíferos	Câncer de mama
Lovenox	3,605	2007	Sanofi-Aventis	E.coli	Doença na artéria coronária
Bevacizumab	3,424	2004	Genentech e Roche (Avastin®)	Cel. Mamíferos	Câncer
Adalimumab	3,000	2002	Abbott Laboratories (Humira®)	Cel. Mamíferos	Artrite reumatóide
Hormônios de crescimento	2,545	1985	Pfizer, Novo Nordisk, Eli Lilly, Serono, Roche/Genentech	E.coli	Deficiência em hormônio de crescimento
Prevnar/Prevenar	2,439	2002	Wyeth	Microrganismos	Prevenção de doenças pneumocócicas
Gardasil	1,481	2006	Merck	Leveduras	Prevenção de câncer vaginal
Cetuximab	1,336	2004	Merck-Serono, BMS (Erbitux ®)	Cel. Mamíferos	Câncer
Ranibizumab	1,219	2006	Genentech, Novartis (Lucentis ®)	E.coli	Degeneração macular
Palivizumab	1,200	1998	MedImmune (Synagis ®)	Cel. Mamíferos	Infecção respiratória pelo vírus Syncytial
β- Glucocerebrosidase	1,144	1994	Genzyme (Cerezyme®)	Cel. Mamíferos	Doença de Gaucher

Tabela 3.1 - Prine	cipais biofármacos	vendidos mundia	almente em 2007.

Fonte: Zhu (2012).



Figura 3.2 - Concentração global das empresas de produção de biofármacos e vacinas. Fonte: Top1000Bio (2013).

3.1.2 Sistemas de expressão de biofármacos

A seleção de um sistema de expressão depende de diversos fatores e é um ponto chave para a definição da eficiência e viabilidade do processo de produção de biofármacos. Estes fatores estão relacionados ao organismo utilizado no processo, às suas capacidades e limitações relacionadas à produtividade celular e da proteína de interesse. Também deve-se considerar a complexidade das proteínas produzidas, além de aspectos como a bioatividade das mesmas e suas características físico-químicas, que serão comentadas no item 3.1.2.1. A tabela 3.2 resume algumas características dos principais sistemas utilizados na produção de proteínas recombinantes.

Em processos para produção de biofármacos utilizando bactérias, como o processo de produção de insulina, a *E. coli* é o principal microrganismo utilizado. Suas principais vantagens estão em sua elevada velocidade específica de crescimento e elevados níveis de produtividade. Além disso, o custo de síntese de proteínas recombinantes neste sistema é baixo, principalmente, quando comparado aos outros sistemas. Este baixo custo é devido a diversos fatores. Bactérias requerem equipamentos de cultivo com custo mais baixo, apresentam baixas exigências nutricionais, o que diminui consideravelmente o custo do meio de cultura e também possuem uma ampla disponibilidade de sistemas de expressão, diminuindo o custo de desenvolvimento de novas linhagens (VERMASVUORI et al., 2009; YIN et al., 2007).

Características		E. coli	Leveduras	Células de Insetos	Células de Mamíferos
Velocidade máxima específica de crescimento celular ($\mu_{X,MAX}$)		Excelente	Muito boa	Aceitável – baixa	Aceitável – baixa
Tempo de duplicação		30 min	90 min	18 a 24 h	~24h
Custo de produção		Baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Produtividade		Muito alta	Alta	Média	Baixa
Custo do meio		Muito baixo	Muito baixo	Médio	Alto
Susceptibilidade ao cisalhamento		Baixa	Baixa	Alta	Média
Disponibilidade de sistemas de expressão		Muito boa	Boa	Razoável	Razoável
Secreção		Pobre	Muito boa	Muito boa	Excelente
Modificações Pós-Tradução	N-Glicosilação	Nenhuma	Simples (alta em 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

 Tabela 3.2 - Comparação entre os principais sistemas de expressão de biofármacos: bactérias (E. coli), leveduras, células de insetos e células de mamíferos.

Fonte: Baseado em Carrondo (2011), Cha et al. (2005), Ramirez (2004) e Yin et al. (2007).

Por outro lado, algumas proteínas produzidas por bactérias como a *E. coli* não são secretadas e ficam armazenadas em corpos de inclusão, exigindo etapas a mais no processo de produção. Além de uma etapa de rompimento celular para extração da proteína de interesse. Estes corpos de inclusão, os quais armazenam não apenas a proteína de interesse, mas também outras proteínas produzidas pelo microrganismo, devem ser desagregados de forma a se obter somente a proteína de interesse, a qual ainda deve ser submetida a um processo de *refolding* para recuperar sua conformação original. Diversos esforços, no sentido de promover a capacidade de secreção de proteínas neste sistema, tem sido dirigidos para eliminar esta desvantagem (NI; CHEN, 2009). Estas etapas adicionais, necessárias ao processo de purificação da proteína, acabam por aumentar o custo total de produção da proteína. No entanto, comparativamente aos outros sistemas de produção, este custo ainda é considerado baixo (VERMASVUORI et al., 2009).

A utilização de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, tem como grande atrativo a combinação das vantagens das bactérias em geral, como altas velocidades específicas de crescimento, baixo custo de produção e alta produtividade, mas com a habilidade de secretar adequadamente as proteínas produzidas. Assim como acontece para bactérias, leveduras possuem uma ampla variedade de sistemas de expressão disponíveis, requerem equipamentos com menor complexidade e apresentam baixas exigências nutricionais, de forma que o custo do meio de cultura também é baixo, fazendo com que o custo de produção como um todo seja reduzido (VERMASVUORI et al., 2009; YIN et al., 2007).

As células de insetos são o sistema que mais se assemelha às células de mamíferos (Tabela 3.2). Apresentam velocidade específica de crescimento mais baixa e, consequentemente, maiores tempos de duplicação, da ordem de dezenas de horas e possuem exigências nutricionais mais complexas do que bactérias e leveduras, o que costuma elevar o custo do meio de cultura, especialmente em processos que utilizam soro fetal bovino (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012). O desenvolvimento de linhagens produtoras de células de inseto requer a utilização de vetores comerciais, que não são tão numerosos e apresentam custo mais elevado. Além disso, estas células possuem elevada sensibilidade ao cisalhamento, requerendo equipamentos mais específicos. Estes fatores contribuem fortemente para o elevado custo de produção neste sistema (VERMASVUORI et al., 2009).

O grande interesse da utilização de células de inseto está relacionado ao sistema de expressão por baculovírus (BEVS – *Baculovirus Expression Vector System*), um sistema de expressão transiente que é caracterizado pela alta produtividade, mas que tem a desvantagem de ser um sistema lítico, ou seja, o momento em que se inicia a expressão da proteína de interesse pode determinar o fim do cultivo. Uma alternativa para o BEVS é a utilização de células de inseto estáveis para a expressão constitutiva. No entanto, sua utilização na indústria é limitada por apresentar menor produtividade e com custos maiores que o sistema BEVS (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

Em termos de crescimento celular, as células de mamíferos possuem diversas desvantagens em relação aos microrganismos. Além de apresentar velocidades de crescimento muito baixas, as dificuldades do cultivo são mais altas. Muitos processos são feitos com células aderentes, o que gera uma dificuldade em relação ao aumento de superfície para aumentar a produtividade celular, uma vez que o aumento de escala é diretamente dependente do aumento da disponibilidade de área para adesão. Mesmo em cultivos com células em

suspensão, alguns fatores como a transferência de oxigênio, por exemplo, são críticos. Devido à alta susceptibilidade destes organismos ao cisalhamento, o aumento da agitação ou o borbulhamento de gases são prejudiciais, de tal forma que outras abordagens, como a utilização de sistemas *bubble-free*, devem ser feitas para aumentar a eficiência da transferência de oxigênio do sistema (ver item 3.3 - Biorreatores).

Além disso, o custo de produção neste sistema é elevado. A exigência de equipamentos específicos devido à maior sensibilidade deste sistema e a grande variedade de componentes presentes no meio de cultura, como decorrência das elevadas exigências nutricionais das células de mamíferos, contribuem para este custo (ver item 3.2 – Meio de Cultura). Além disso, processos de purificação de anticorpos monoclonais requerem um passo de cromatografia por afinidade utilizando Proteína A, o que implica em custos elevadíssimos ao processo de purificação (FAHRNER et al., 2001; MEHTA et al., 2008). Nos EUA e na Europa, grande parte dos processos de produção de anticorpos monoclonais ainda tem um custo adicional, mas altamente relevante, que está relacionado ao pagamento de *royalties* à Genentech devido às patentes Cabilly II e III, as quais estão em vigor até o final de 2018 (STORZ, 2012).

3.1.2.1 Glicosilação de proteínas recombinantes

Acima de tudo, a escolha de um sistema de expressão de biofármacos depende da complexidade das proteínas que este sistema é capaz de produzir e o que determina a complexidade de uma proteína são as modificações pós-traducionais nelas contidas.

A glicosilação é a forma mais conhecida dentre as modificações pós-traduções sob as quais uma proteína recombinante pode ser submetida. A glicosilação de uma proteína se inicia quando uma cadeia de carboidratos (glicano) liga-se covalentemente à proteína. Os glicanos podem ligar-se à resíduos de asparagina, formando N-glicanos, ou à resíduos de treonina ou serina, formando O-glicanos. Estas ligações podem alterar significativamente a função e/ou a atividade biológica da uma proteína terapêutica (BUTLER, 2008; HARCUM, 2006).

O processo de N-glicosilação tem início com a transferência do oligoassacarídeo GlcNAc₂Man₉Glc₃, a uma sequência consenso de aminoácidos (Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, com exceção de prolina), no retículo endoplasmático. Em seguida, este oligossacarídeo passa por um processo de remodelagem no próprio retículo endoplasmático, que consiste basicamente na remoção de monossacarídeos, gerando uma estrutura com alto teor de manose, e no complexo de Golgi, onde novos monossacarídeos,

como N-acetil-glicosamina, fucose, galactose e ácido siálico, são adicionados à estrutura através da ação de uma série de transferases presentes nesta organela, até atingir uma forma final, que é caracterizada por possuir um pentassacarídeo central, contendo 3 manoses e 2 resíduos de N-acetil-glicosamina (Man₃GlcNac₂) (BUTLER, 2008; SETHURAMAN; STADHEIM, 2006). A figura 3.3 mostra um esquema da via de N-glicosilação.



Figura 3.3 - Via da N-Glicosilação. Man- Manose, GlnNAc – N-Acetil-Glucosamina, Gal – Galactose, Fuc – Fucose, NeuAc – Ácido siálico (ou Ácido N-Acetil-Neuramínico). Fonte: Butler (2008).

Células procarióticas, como *E. coli*, não possuem vias metabólicas para a glicosilação, de forma que proteínas expressas por este sistema não são glicosiladas (Tabela 3.2) (BUTLER, 2008; FERRER-MIRALES et al., 2009). Apesar disso, a descoberta de uma via de N-glicosilação na bactéria gram-negativa *Campylobacter jejuni* e sua subsequente transferência para *E. coli* iniciou boas perspectivas para a produção de glicoproteínas neste sistema (FISHER et al., 2011; WACKER et al., 2002), o que pode mudar este quadro no futuro (CHEN, 2012).

Por outro lado, leveduras são capazes de realizar satisfatoriamente algumas etapas da via de N-glicosilação, como a síntese do oligassacarídeo precursor, sua transferência para o polipeptídeo e o processamento primário no retículo endoplasmático (BUTLER, 2008). Entretanto, poucos resíduos de manose são removidos durante este processamento de forma que a proteína final é caracterizada por conter altos teores deste monossacarídeo (SETHURAMAN; STADHEIM, 2006), o que pode reduzir o tempo de meia-vida do fármaco

no corpo do paciente, além de afetar a imunogenicidade da proteína (DUROCHER e BUTLER, 2009; FERRER-MIRALLES et al., 2009). Por este motivo, os principais esforços relativos a este sistema de cultivo, nas últimas duas décadas, foram direcionados para a humanização da cadeia de N-glicosilação, focadas na deleção dos genes envolvidos na hipermanosilação nas proteínas (ÇELIK; ÇALIK, 2012). Dos biofármacos produzidos por leveduras, destacam-se a insulina, o antígeno de superfície da hepatite B, os glucagons e os fatores de crescimento (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

As células de insetos são capazes de realizar modificações pós-tradução com padrões muito semelhantes às células de mamíferos, sendo capaz de fazer todo o processamento estrutural para a formação do oligossacarídeo central Man₃GlcNAc₂. No entanto, o processamento após a formação desta estrutura é praticamente inexistente, com exceção da possibilidade de adição de fucoses, o que pode aumentar a imunogenicidade da proteína (BUTLER, 2008; SETHURAMAN; STADHEIM, 2006). Outra grande desvantagem é o fato da N-glicosilação não apresentar adição de ácido siálico, que é importante para manter altos tempos de meia-vida na circulação e prevenir a eliminação do biofármaco por receptores do fígado (DUROCHER; BUTLER, 2009; FERRER-MIRALLES et al., 2009). O principal biofármaco produzido pelo sistema células de inseto-baculovírus é o Cervarix® da GlaxoSmithKline, uma vacina contra o vírus do papiloma humano. Além disso, existem outros medicamentos em desenvolvimento ou em fase final de aprovação, como o Provenge®, da Dendreon, para tratamento de câncer de próstata; o FluBok® (Protein Sciences Co.), uma vacina contra a gripe; o Glybera® (AMT), para casos de deficiência de lipoproteína lipase e o Diamid® (Diamyd Medical), uma vacina contra diabetes tipo I (MORAES et al., 2012).

Células de mamíferos são capazes de realizar toda a via de N-glicosilação satisfatoriamente, produzindo proteínas muito similares àquelas produzidas em humanos (ZHU, 2012). Além disso, estas células são as únicas, dentre os sistemas mencionados, capazes de realizar a γ -carboxilação (Tabela 3.2), a qual é um outro tipo de modificação pós-traducional, de extrema importância para a atividade biológica de proteínas de coagulação sanguínea (BUTLER, 2008). Por este motivo, as células de mamíferos são os sistemas mais utilizados na produção de biofármacos complexos (Tabela 3.1).

Células de murinos, como CHO e BHK, são as principais linhagens de células de mamíferos utilizadas para a produção de proteínas recombinantes. Apesar de serem sistemas muito estudados e bem estabelecidos, com a capacidade de produzir proteínas com padrões de

glicosilação similares àqueles encontrados em proteínas humanas, estas células ainda apresentam algumas desvantagens. Proteínas produzidas por células CHO, por exemplo, contém ácido N-glicolilneuramínico, cuja via de síntese é inexistente em humanos. A presença deste monossacarídeo pode facilitar a eliminação da proteína pela ação de anticorpos anti-ácido-N-glicolilneuramínico, presente no soro humano. Além disso, proteínas produzidas por células CHO mostram uma heterogeneicidade inerente, o que resulta em um conjunto de proteínas com diferentes perfis de eficiência (SETHURAMAN; STADHEIM, 2006). De modo geral, algumas glicosidases, glicosiltransferases e doadores de açúcares específicos, presentes em humanos, mas inexistentes em células de murinos, podem aumentar a imunogeneicidade das proteínas produzidas nestas linhagens (SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2012).

A utilização de linhagens de células humanas, como a HEK293 e a PER.C6, é uma alternativa promissora para a produção de proteínas recombinantes com padrões de N-glicosilação idênticos àqueles encontrados no soro humano. Quando comparadas às linhagens de murinos, as linhagens humanas ainda dispõem de poucas informações (SWIECH et al., 2011). No entanto, progressos têm sido feitos e alguns terapêuticos já foram aprovados, dentre os quais se podem citar o Xigris[®] (proteína C ativada), produzido em células HEK293; e a Elaprase[®] (idunorato-2-sulfatase) e o Replagal® (α-galactosidase A), ambos produzidos na linhagem de fibrosarcoma HT-1080 (DUROCHER; BUTLER, 2009).

Além dos padrões inerentes a linhagens celulares utilizadas, a glicosilação das proteínas também é diretamente dependente das condições de cultivo, as quais esta é submetida (HARCUM, 2006). Hayter et al. (1992, 1993) demonstraram que a glicosilação depende dos componentes do meio de cultura e que a glicosilação de interferon- γ ocorria de forma mais adequada, quando o cultivo não tinha limitação de glicose.

Altas concentrações de amônia também resultam em efeitos deletérios à glicosilação de proteína. Gawlitzek et al. (2000), em cultivos de CHO produzindo TNFR-IgG, observaram uma redução de 40% na adição de galactose e ácido siálico terminais ao aumentar a concentração de amônio de 17 para 255 mg/L. Efeitos semelhantes foram observados em outros trabalhos (YANG; BUTLER, 2000). Alterações no pH de cultivos também mostraram influenciar a adição de galactose e de ácido siálico às proteínas (BORYS; LINZER; PAPOUTSAKIS, 1993; MUTHING et al., 2003).

Lin, Kimura e Miller (1993) observaram que diferentes níveis de oxigênio dissolvido não influenciaram a glicosilação de tPA em células CHO. Por outro lado, Kunkel et al. (1998) observaram que, conforme diminui-se o oxigênio dissolvido de 100 para 10%, obteve-se uma redução na adição de galactoses a anticorpos monoclonais.

3.2 Meios de cultura

As necessidades nutricionais para o cultivo de células animais começaram a ser estudadas na década de 50, principalmente devido à necessidade de produção de vacinas em larga escala. Antes disso, as células eram cultivadas, sem reprodutibilidade, em fluidos biológicos de composição indefinida, como soro e outros extratos de sangue e tecidos (BUTLER; JENKINS, 1989). Os primeiros meios de cultura foram desenvolvidos a partir da análise de plasma e outros fluidos biológicos (BURGENER; BUTLER, 2006). Eagle (1955) fez um estudo mais aprofundado e definiu um determinado número de componentes essenciais e a mínima concentração de cada um destes necessários para o crescimento celular. Esta formulação, conhecida como MEM (Minimum Essential Media), foi o primeiro meio de cultura quimicamente definido e utilizado amplamente no cultivo de células animais (BURGENER; BUTLER, 2006; BUTLER; JENKINS, 1989).

O meio de cultura agrega diversas funções, desde manter as condições físico-químicas, como o pH e a osmolalidade, em níveis apropriados para o crescimento celular, até suprir todos os nutrientes, como aminoácidos, carboidratos e vitaminas, os quais não podem ser sintetizados pelas células e que são essenciais para o anabolismo e catabolismo celular (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

A glicose é considerada o carboidrato principal para o crescimento celular, atuando como fonte de carbono. Utiliza-se, normalmente, concentrações na faixa de 5 a 25 mM (0,9 a 4,5 g/L), mas alguns meios de cultura apresentam concentrações de até 56 mM (10 g/L). O consumo de glicose leva à formação de lactato que, em altas concentrações, tem efeito deletério ao crescimento celular (BURGENER; BUTLER, 2006; MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008). Algumas formulações de meio de cultura utilizam a substituição, parcial ou total, de glicose por outros carboidratos, como a frutose, manose, galactose e maltose, o que leva à redução na sua taxa de consumo e, consequentemente, à redução na produção de lactato (ALTAMIRANO et al., 2006; BERRIOS et al., 2009; MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008; WILKENS; ALTAMIRANO; GERDTZEN, 2011).

A formulação de meios de cultura também requer a adição de aminoácidos essenciais, ou seja, aqueles que não são sintetizados no metabolismo celular. Normalmente, também são adicionados aminoácidos não-essenciais, pois muitas vezes, apesar de poderem ser produzidos pelas células, estes não o são em quantidade suficiente para manter o crescimento. De modo geral, os aminoácidos são adicionados como componentes definidos no meio de cultura. Existem, no entanto, outras fontes de composição indefinida, como soro, lactalbumina e hidrolisados de plantas ou de animais (BURGENER; BUTLER, 2006; MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

A glutamina é o aminoácido mais importante e é normalmente adicionado aos meios de cultura em concentrações elevadas, variando de 0,7 a 5 mM (102 a 730 mg/L). No entanto, não apenas o consumo, mas também a degradação natural deste aminoácido leva à produção e ao acúmulo de amônio que, de forma similar ao lactato, tem efeitos tóxicos quando em altas concentrações. Alternativas para evitar o acúmulo deste subproduto são a utilização de glutamato ou de dipeptídeos, como a L-alanil-L-glutamina ou a glicil-L-glutamina (ATANASSOV; SEILER; REBEL, 1998; BIGGERS; McGINNIS; LAWITTS, 2004; BURGENER; BUTLER, 2006).

Em cultivos com células de mamíferos, costuma-se adicionar bicarbonato de sódio ao meio de cultura que, juntamente com uma atmosfera de CO_2 em concentrações entre 5 e 10% (v/v), permite que o pH do meio de cultura seja mantido na faixa ótima de 6,9 a 7,4. A desvantangem deste sistema é que, quando retiradas do ambiente com concentração controlada de CO_2 , o meio de cultura pode tornar-se rapidamente muito alcalino. Para evitar isso, costuma-se adicionar o tampão orgânico HEPES em concentrações de aproximadamente 25 mM (BURGENER; BUTLER, 2006).

A adição de sais ao meio de cultura visa manter o balanço iônico e a pressão osmótica. De modo geral, meios de cultura apresentam osmolalidade na faixa entre 260 e 320 mOsm/kg (FRESHNEY, 2005) e valores fora desta faixa causam efeitos deletérios ao crescimento celular (BERG; OYAAS; LEVINE, 1991; KURANO et al., 1990). Os sais mais utilizados são aqueles com íons Ca²⁺, Na⁺, K⁺ e Cl⁻, os quais atuam na regulação do potencial da membrana celular, e com SO₄²⁻, PO₄³⁻ e HCO₃⁻, os quais são precursores de macromoléculas e reguladores da carga intracelular (FRESHNEY, 2005). Sais com carga divalente, em particular o Ca²⁺, são necessários para algumas moléculas que atuam na adesão celular. Assim, sais contendo estes íons são utilizados em meios para cultivo de células aderentes e são evitados em cultivos de células em suspensão (FRESHNEY, 2005).

A adição de vitaminas ao meio de cultura se faz necessária especialmente em meios sem soro, uma vez que este componente fornece a maior parte das vitaminas necessárias ao cultivo. A biotina, o ácido fólico, a niacina, o ácido pantotênico, a tiamina, o ácido ascórbico e as vitaminas B12, A, D, E e K devem ser fornecidas pelo meio de cultura (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

O soro, normalmente obtido do plasma de bezerros e fetos bovinos ou equinos, também é um componente importante dos meios de cultura. É composto por aminoácidos, proteínas, lipídeos, sais minerais, fatores de adesão, micronutrientes, fatores de crescimento (hormônios e proteases), elementos protetores (antitoxinas, antioxidantes e antiproteases). Em geral, o soro é adicionado em concentrações entre 5 e 10% (v/v) ao meio de cultura (BURGENER; BUTLER, 2006; MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

Entretanto, a utilização de soro apresenta algumas desvantagens, dentre as quais podemse destacar (BURGENER; BUTLER, 2006; VAN DER VALK et al., 2010):

- a variação entre lotes, o que pode causar inconsistência entre cultivos celulares;
- a alta concentração de proteínas, que pode dificultar e/ou aumentar os custos de purificação;
- o risco de contaminantes como vírus, micoplasma e príons e o risco de transmissão destes contaminantes para produtos finais utilizados em humanos;
- disponibilidade limitada de soro fetal, com períodos de carência mundial;
- alto custo.

Desta forma, existe uma tendência a se utilizar meios livres de soro e, em processos de produção de biofármacos para uso humano, a remoção do soro é uma exigência de agências regulatórias. No entanto, pelo fato do soro apresentar uma formulação indefinida, existe uma dificuldade em descobrir quais são os suplementos necessários para substituí-lo efetivamente. Como alternativa, muitas formulações de meios utilizam peptonas ou hidrolisados de animais ou plantas, os quais, apesar de indefinidos, podem suprir efetivamente as necessidades celulares. Não obstante, estes componentes apresentam algumas desvantagens semelhantes às do soro, como o risco de contaminação e inconsistência entre lotes (BURGERNER; BUTLER, 2006).

Meios quimicamente definidos são ideais para evitar a variabilidade entre lotes, facilitar o processo de purificação de proteínas e eliminar riscos de contaminação. Muitos componentes de origem animal, necessários para o crescimento celular, podem ser substituídos por produtos químicos sintéticos bioativos ou compostos originários de fermentação microbiana. A utilização deste tipo de meio também tem a vantagem de poder facilitar a aprovação de proteínas produzidas em células animais junto às agências regulatórias (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

A adição de surfactantes, como o Pluronic F68, polietileno glicol ou polivinil álcool, ao meio de cultura tem sido uma estratégia comumente utilizada para proteger a cultura celular dos efeitos de cisalhamento, através de dois mecanismos: (a) mudanças nas propriedades físicas do meio para formação de camadas ar-líquido e; (b) interações com a membrana celular, produzindo uma camada de Pluronic polyol na superfície celular, o qual pode inibir interações potencialmente danosas entre a membrana celular e a interface ar-líquido (MURHAMMER; GOOCHEE, 1990; WU, 1999).

3.2.1 Adaptação Celular

Hayashi e Sato (1976) fizeram um trabalho pioneiro na substituição de soro em cultivo de células adicionando hormônios selecionados, os quais promoveram crescimento e estimularam a diferenciação entre células específicas, o que levou ao desenvolvimento de um meio quimicamente definido e livre de soro. Nos últimos anos, estudos sobre as funções celulares possibilitaram a identificação de inúmeros componentes que se mostraram úteis no desenvolvimento dos meios livres de soro. Atualmente, cerca de 450 diferentes formulações de meios isentos de soro estão disponíveis comercialmente, mas apenas para um número limitado de linhagens celulares (VAN DER VALK et al., 2010).

A adaptação ao crescimento em suspensão e em meio o meio livre de soro, geralmente é realizada com células que já tenham sido modificadas geneticamente para expressar a proteína terapêutica desejada. Entretanto, alguns trabalhos investigaram a prévia adaptação ao cultivo em suspensão em meio isento de soro de células CHO, mieloma murino e Namalwa antes de servirem como células hospedeiras (SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000).

A fim de minimizar impactos negativos no crescimento celular durante o processo de adaptação de células aderentes e dependentes de soro, Sinacore, Drapeau e Adamson (2000) sugeriram um protocolo de adaptação em 3 fases: na primeira fase as células deveriam ser adaptadas ao crescimento em suspensão, na segunda estas células deveriam ser adaptadas ao meio isento de soro e, por fim, na terceira fase, as células deveriam ser adaptadas às condições de alta densidade celular.

Existem diversas metodologias para adaptar uma linhagem. De modo geral, procura-se reduzir gradativamente a quantidade de soro no meio de cultura, evitando-se criar condições

adversas ao crescimento celular. No entanto, deve-se ressaltar que o processo de adaptação pode resultar em uma seleção indesejada de subpopulações com a capacidade de crescer em meios sem soro (VAN DER VALK et al., 2010).

O processo de adaptação pode levar a mudanças no crescimento e metabolismo da linhagem celular. El-Ensahsy et al. (2009) observaram que, na faixa entre 5 e 15% de soro fetal bovino adicionado ao meio de cultura Ham F-12, a maior concentração de soro promovia aumento no crescimento e na viabilidade celular de células HeLa-S3. Além disso, células adaptadas ao meio livre de soro apresentaram redução no consumo de glicose e na produção de lactato.

Ozturk e Palsson (1991a) observaram que a redução da proporção de soro no meio de cultura implicava em redução na concentração máxima de células viáveis e na velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$). No entanto, não se observou correlação clara entre a proporção de soro no meio de cultura e a produção de anticorpos monoclonais nestes cultivos.

Outros trabalhos mostram que a adaptação de linhagens recombinantes a meios sem soro reduz a produtividade celular e afeta as modificações pós-traducionais da proteína e sua atividade biológica (BLACK et al., 1995; LEFLOCH et al., 2006). Portanto, as características gerais do desempenho, do crescimento, bem como a integridade estrutural e funcional da proteína expressa pelas linhagens em processo de adaptação, devem ser constantemente monitoradas ao longo do processo.

3.3 Biorreatores

A seleção dos sistemas para ampliação de escala de processos com células animais dependem de diversos fatores que estão diretamente relacionados às características da linhagem celular utilizada. Diferentemente de células microbianas e leveduras, nem todas as linhagens de células animais são capazes de crescer em cultivos em suspensão. Algumas linhagens são aderentes, ou seja, necessitam de um suporte para o crescimento. O primeiro passo para determinar as caraterísticas do sistema utilizado no processo é identificar se a linhagem celular utilizada é dependente de suporte ou se está adaptada ao crescimento em suspensão.

Porém, de modo geral, visando garantir a proliferação de células e produção da proteína de interesse, é desejável que biorreatores assegurem as seguintes condições (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008):

- controle de pH do meio de cultivo;
- controle da temperatura;
- troca de gases de forma a permitir o suprimento adequado de O₂ e a eliminação do excesso de CO₂;
- suprimento e, em alguns casos, controle do fornecimento de nutrientes, utilizando meios de cultivo com formulação adequada;
- suprimento de suporte para adesão celular, no caso de cultivo de células aderentes;
- manutenção de assepsia, evitando contaminação por microrganismos, vírus e outras células.

3.3.1 Cultivos de células em suspensão

Algumas linhagens celulares tem a capacidade de crescimento em suspensão, sem necessidade de suporte para adesão. Os primeiros produtos interessantes comercialmente produzidos em células em suspensão (como a vacina contra febre aftosa, em células BHK, e o interferon, produzido em células Namalva) deram início a um processo de adaptação de sistemas de biorreatores utilizados em cultivos microbianos para o cultivo de células animais (FENGE; LÜLLAU, 2006).

O biorreator tipo tanque agitado é o mais utilizado em processos em larga escala com células animais. De modo geral, estes biorreatores possuem configurações muito semelhantes àqueles utilizados na fermentação de microrganismos microbianos, sendo em forma cilíndrica e com a mistura sendo promovida através da utilização de impelidores (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008). Diversos fabricantes, tais como a B. Braun, Bioengineering e New Brunswick, disponibilizam biorreatores tipo tanque agitado com volumes de trabalho variando entre 0,5 e 15.000 L.

Este tipo de biorreator tem sido utilizado na produção de uma ampla gama de produtos, tais como anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes, como o fator VIII de coagulação, tPA, eritropoietina, e outras proteínas utilizadas em terapias de substituição, vacinas, fatores de crescimento e interferon (FENGE; LÜLLAU, 2006).

Os principais aspectos que devem ser considerados em um biorreator de tanque agitado para operação com células animais estão relacionados às exigências específicas deste sistema, sendo que as principais estão diretamente ligadas ao controle das tensões de cisalhamento do sistema, de forma a permitir a homogeneidade do cultivo e a adequada transferência de gases, sem causar danos à população celular. Este é um ponto crítico em processos que utilizam alta concentração de células animais.

Os biorreatores do tipo *air-lift* são uma alternativa para o cultivo de células em suspensão e são caracterizados pela elevada razão altura/diâmetro e pela existência de um cilindro concêntrico em seu interior. No fundo deste cilindro, o gás é injetado e as bolhas geradas criam uma região de baixa densidade no interior do cilindro, de forma que as bolhas ascendem. Este movimento empurra o líquido, o qual circula pela região externa do cilindro e regressa para baixo, entrando no cilindro pela parte inferior. Este movimento do *air-lift* mantém a homogeneidade do sistema e promove oxigenação sem a utilização de impelidores (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008). De modo geral, este tipo de biorreator é muito pouco utilizado quando comparado aos biorreatores de tanque agitado. Isto ocorre principalmente devido à baixa flexibilidade dos *air-lifts* para o aumento de escala e também pelas possibilidades limitadas de utilização de microcarregadores neste sistema (MA; MOLLET; CHALMERS, 2006). Atualmente, apenas a empresa Lonza utiliza este tipo de biorreator em larga escala (2 m³) para produção de anticorpos monoclonais (MA; MOLLET; CHALMERS, 2006).

Também já foram reportados biorreatores *air-lift* híbridos que apresentam um eixo com impelidores no centro do cilindro, os quais operam com baixa velocidade de rotação e são responsáveis por um aumento na eficiência na transferência de oxigênio (CHISTI; JAUREGUI-HAZA, 2002).

O biorreator de fibras ocas (*hollow fiber*) é formado de um cilindro plástico, em cujo interior estão contidas centenas de membranas semipermeáveis, em forma de capilares (fibras ocas). As células são inoculadas no espaço exterior às fibras, sobre o qual há colonização e crescimento celular. No interior das fibras, passa-se continuamente o meio de cultivo. O caráter poroso das fibras permite que os nutrientes do meio sejam difundidos em direção à população celular e os produtos (de interesse e inibidores) difundidos na direção oposta e sendo diluídos no meio circulante (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008). De modo geral, este tipo de biorreator é utilizado no cultivo de células em suspensão, mas dependendo do material da membrana utilizado, também podem ser utilizados com células aderentes

(FENGE; LÜLLAU, 2006). A principal aplicação para biorreatores de fibra oca é a produção de anticorpos monoclonais, em geral para aplicações diagnósticas ou de pesquisa (DOWD et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2005).

Em processos industriais, uma tendência que surgiu nos últimos anos é a utilização de biorreatores descartáveis, cujas principais vantagens são a flexibilidade e a facilidade de manipulação do sistema, a redução dos índices de contaminação, a economia de tempo e custos e, principalmente, a eliminação da necessidade de validar processos de limpeza e esterilização, uma vez que a esterilidade destes biorreatores é garantida pelo fabricante (EIBL et al., 2010). Biorreatores descartáveis também reduzem significativamente a necessidade de algumas utilidades, como por exemplo, o vapor utilizado para esterilização do equipamento. Pode-se, inclusive, afirmar que os benefícios ambientais da redução da necessidade de energia são mais significativos que os resíduos sólidos gerados por estes sistemas (SHUKLA; GOTTSCHALK, 2013).

Atualmente, existem diversas alternativas de biorreatores descartáveis, dentre os quais os mais utilizados são: a) os biorreatores tipo Ondas (WAVE, Figura 3.4a e 3.4b), usados principalmente em pequena (2 a 10 litros) e média (25 a 50 litros) escala, no qual a agitação é feita por um movimento ondulatório; e b) SUBs (*Single Use Bioreactors*, Figura 3.4c), os quais são reatores de tanque agitado de até 2000 litros, nos quais todo o sistema – tanque, impelidor, o eixo de rotação e, em alguns casos, os sensores (de pH, pO₂, etc) - é descartável.



Figura 3.4 - Biorreatores descartáveis. (a) e (b) Biorreator tipo Ondas (WAVE); e (c) *Single Use Bioreactor* (SUB).

3.3.2 Cultivo de células aderentes

Inicialmente, cultivos de células aderentes eram feitos em garrafas de vidro, mais especificamente em borossilicato, que contém alto teor de sílica e favorece a adesão celular (LÉO et al., 2008). No início da década de 1950, a metodologia utilizada para a ampliação de escala era restrita ao aumento do número de frascos, uma vez que o custo dos produtos e a necessidade de rápida entrada no mercado não tornava viável a otimização de processos (PAPOUTSAKIS, 2009). No final da década de 60, iniciou-se o uso de materiais plásticos, principalmente poliestireno, que mantinham algumas características das garrafas de vidro, como a hidrofilicidade e a carga negativa (LÉO et al., 2008).

Atualmente, células aderentes são comumente cultivadas em frascos tipo T (Figura 3.5a), que dispõem de 25 a 225 cm² de área para adesão celular. A abordagem imediata para aumento de escala neste sistema foi a utilização de garrafas *Roller* (Figura 3.5b), que dispunham de maior área para adesão celular (500 a 1750 cm²). Nas últimas décadas, tornaram-se disponíveis sistemas de cultivo para células aderentes com maior disponibilidade de área, como por exemplo o *CellStack*[®] e o *CellCube*® (Figura 3.5c e 3.5d, respectivamente).



Figura 3.5 - Sistemas de cultivos de células aderentes. (a) Frasco T; (b) Garrafas *Roller*; (c) *CellStack*[®]; e (d) *CellCube*[®].

No entanto, estes sistemas ainda são restritos no que se refere ao aumento de escala, uma vez que o aumento do volume de produção está diretamente relacionado ao aumento no número de unidades do sistema, o qual pode ser limitado pelo espaço físico do local de produção. Além disso, aumenta-se o risco de contaminação, devido ao aumento no número de manipulações das unidades.

3.3.2.1 Microcarregadores

Os microcarregadores são uma alternativa à ampliação de escala por aumento de volume para linhagens dependentes de suporte para adesão. De modo geral, todas as linhagens, exceto aquelas derivadas de células sanguíneas são naturalmente dependentes de suporte, tais como fibroblastos e células endoteliais (FRESHNEY, 2005). São partículas, feitas de materiais porosos. No entanto, dependendo da dimensão dos poros, podem ser classificados em macroporosos ou microporosos.

Os microcarregadores microporosos apresentam poros menores que o diâmetro celular, de forma que não há crescimento no interior dos poros. Como consequência, as células crescem apenas na superfície, estando mais sujeitas a danos por choques mecânicos. Este tipo de microcarregadores está disponível com diâmetros entre 90 e 300 µm (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008).

Por outro lado, os microcarregadores macroporosos são partículas com diâmetros entre 0,4 a 5mm e com poros maiores, com diâmetros entre 10 e 400 µm, o que possibilita o crescimento celular no interior dos mesmos. Este tipo de microcarregadores permite atingir maiores concentrações celulares (devido à maior disponibilidade de área por partícula) e sua configuração permite uma certa proteção contra choques (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008). A tabela 3.3 apresenta alguns dos microcarregadores macro e microporosos disponíveis atualmente e os materiais dos quais eles são produzidos.

Van Wezel (1967) foi o primeiro a publicar um estudo utilizando microesferas de DEAE-Sephadex A50 para o cultivo de linhagens primárias e imortalizadas de células animais. Nas primeiras décadas, os principais estudos utilizavam materiais que otimizavam o crescimento. Na década de 1980, a tecnologia de DNA recombinante permitiu a clonagem de componentes animais e virais e isto aumentou o interesse no estudo de produção de proteínas recombinantes utilizando microcarregadores (VAN DER VELDEN-DE GROOT, 1995).

Produto	Material	Fabricante			
	Microcarregadores microporos	505			
Biosilon®	Poliestireno com carga superficial negativa	Nunclon			
Cytodex TM 1	Dextrana reticulada com grupamentos DEAE	GE Healthcare			
Cytodex TM 3	Dextrana reticulada recomberta com camada de colágeno desnaturado	GE Healthcare			
HyQ [®] Sphere TM	Poliestireno com diversas variantes de recobrimento e carga	Hyclone/SoloHill			
Microcarregadores macroporosos					
CultiSpher [®]	Gelatina suína reticulada	Percell Biolytica			
Cytoline TM	Polietileno/sílica	GE Healthcare			
Cytopore TM	Celulose reticulada com grupamentos DEAE	GE Healthcare			
Fonte: Chico, Rodriguez e Figueredo (2008).					

 Tabela 3.3 - Microcarregadores disponíveis comercialmente.

Atualmente, os microcarregadores são amplamente utilizados em estudos para produção de proteínas recombinantes (BLECKWENN et al., 2005a, b; FLIEDL; KAISERMAYER, 2011; SUNLEY; THARMALINGAM; BUTLER, 2008), anticorpos monoclonais (TRILL; SHATZMAN; GANGULY, 1995), fatores de crescimento (KNIBBS et al., 2003), células endoteliais humanas funcionalmente ativas (TASHIRO; TSUMOTO; SANO, 2012), células-tronco (PHILLIPS et al., 2008) e de vacinas (FRAZZATI-GALLINA et al., 2001, 2004; LANTIERI, 2006).

Este sistema permite a operação em volumes de até 10.000 L e apresenta diversas vantagens (AUGUSTO; OLIVEIRA, 2001; BLUML, 2004; CHU; ROBINSON, 2001), como a redução do número de manipulações, o que reduz o risco de contaminação. Além disso, a homogeneidade do sistema é maior e é possível aplicar técnicas de monitoramento e controle de processo. Também é um excelente método para retenção celular, especialmente em sistemas operados em perfusão (BLECKWENN et al., 2005b; TRABELSI et al., 2005).

Por outro lado, em relação a outros sistemas para células dependentes de suporte (Figura 3.4), a dificuldade para remover as células aderidas é maior. Mas o ponto mais crítico é que células cultivadas em microcarregadores estão expostas a forças de cisalhamento maiores, o que pode danificá-las (DOYLE; GRIFFITHS, 1999). De acordo com Cherry e Papoutsakis (1988), o cisalhamento em cultivos com microcarregadores pode ser decorrente de três mecanismos: a colisão entre *beads*, colisões entre os *beads* e o impelidor e interações diretas entre as células e turbilhões causados pela agitação e aeração.

Fliedl e Kaisermayer (2011) obtiveram concentrações de até 2,5x10⁶ cel/mL no cultivo de células HEK293 transfectadas, em meio sem soro, com microcarregadores CytodexTM 1. Voigt e Zintl (1999) reportaram que o cultivo de hibridomas, em frascos *Spinner*, utilizando meio livre de proteínas UltraDOMA-PF e em meio RPMI com 10% de soro de bezerro atingia concentrações de 1,2 a 1,4x10⁶ cel/mL em microcarregadores CytolineTM 2 (GE Healthcare, USA). No entanto, o cultivo com meio RPMI suplementado com soro de bezerro apresentou tempo de duplicação 30% menor que o obtido no cultivo com meio UltraDOMA-PF.

Gawlitzek et al. (1995) cultivaram células BHK-21 em modo perfusão em um biorreator de 2,5 L, com microcarregadores CytodexTM 3, e conseguiram atingir concentrações de até 1×10^7 cel/mL utilizando uma mistura de meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) e meio Ham's F-12, com concentrações de FCS de 0 e 2%.

3.3.3 Transferência de oxigênio e cisalhamento

Em processos com células animais, existem dois pontos críticos que devem ser considerados: a transferência de oxigênio e as forças cisalhantes atuantes no sistema. De forma geral, pode-se fornecer oxigênio ao cultivo de diversas formas. A mais simples e fácil é a aeração superficial, a qual é caracterizada por baixos valores de coeficiente volumétrico de transferência de O_2 e, por este motivo, é utilizada basicamente em cultivos em pequena escala e com baixas concentrações celulares (AUGUSTO; OLIVEIRA, 2001; CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008).

Outro método é a utilização de membranas microporosas ou outras membranas que permitam o fornecimento de oxigênio por difusão. Estas membranas permitem a chamada aeração isenta de bolhas (*bubble free*), procurando diminuir o efeito negativo que estas exercem sobre as células. Este tipo de aeração permite diferentes configurações, nas quais a membrana porosa pode estar localizada interna, externamente ao biorreator ou ainda pode estar integrada a uma ou mais superfícies do biorreator utilizado (SCHNEIDER et al., 1995). A utilização de membranas é adequada para biorreatores de escalas pequena e intermediária (volumes entre 10 e 500 L). No entanto, não são amplamente utilizadas devido à complexidade dos processos, às informações limitadas com relação à disposição das membranas no biorreatores e às dificuldades com a manutenção e limpeza, principalmente em escalas mais altas (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008; MA; MOLLET; CHALMERS, 2006).

O método mais difundido em processos com células animais é a aeração em profundidade, que consiste no borbulhamento direto de uma corrente gasosa através de um aspersor, o qual pode ser de três tipos: de aço inoxidável sinterizado, capazes de gerar bolhas com diâmetros da ordem de centenas de micrometros, de orifício e de jato, que são capazes de produzir bolhas com diâmetros a partir de 1 mm (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008). A transferência de oxigênio em reatores que utilizam este método depende de três fatores principais: (a) parâmetros de desenho do aspersor, tais como o tipo e tamanho; (b) parâmetros de operação, como velocidade do gás e intensidade de agitação; e (c) propriedades materiais do gás e da cultura (viscosidades, densidades e tensão de superfície) (MA; MOLLET; CHALMERS, 2006).

Diversos estudos mostram que a morte celular é causada principalmente pela explosão das bolhas de ar na superfície do líquido (BUTLER, 2004; KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990a; PAPOUTSAKIS, 2009). Isto ocorre porque, em condições de cultivo, a membrana celular é ligeiramente hidrofóbica, de forma que as células tendem a aderir às bolhas à medida que estas ascendem no biorreator. A bolha explode no momento em que a resistência mecânica desse filme não é suficiente para resistir à pressão dentro dela. A explosão da bolha provoca grandes gradientes de velocidade no líquido imediatamente sob esta, que resulta em níveis de tensão de cisalhamento suficientemente altos para destruir as células nessa região (MEIER; HATTON; WANG, 1999).

As forças cisalhantes advindas da explosão de bolhas podem ser minimizadas pela adição de soro ao cultivo. Kunas e Papoutsakis (1990b) mostraram que o efeito exercido pelo soro não é nutricional, e sim físico. Uma hipótese é que os vários lipídeos presentes no soro, muitos dos quais não são produzidos por células animais, permitem que a célula forme uma membrana mais estável, quando comparadas com aquelas cultivadas em meios livres de soro, nos quais as fontes de lipídeos são mais limitadas (KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990b).

No entanto, como já foi dito anteriormente, existe uma forte tendência de substituição do soro no meio de cultura (item 3.3). Diversos componentes têm sido utilizados para diminuir os efeitos do cisalhamento, sendo o Pluronic F68 um dos mais utilizados. Um dos principais efeitos da adição deste surfactante é a diminuição da tensão superficial do meio de cultura, o que leva à supressão do mecanismo de adesão das células ao filme da bolha (Figura 3.6), diminuindo a morte celular decorrente da explosão de bolhas (MA; MOLLET; CHALMERS, 2006; WU, 1995; ZHANG; HANDA-CORRIGAN; SPIER, 1992).



Figura 3.6 - Imagens microscópicas mostrando efeitos de adesão celular na superfície de bolhas em cultivo com e sem Pluronic F68. (a) Células aderidas ao filme da bolha; e (b) o mesmo sistema contendo Pluronic F68, indicando a ausência de células aderidas ao filme da bolha. Fonte: Ma, Mollet e Chalmers (2006).

Além do cisalhamento causado pelo borbulhamento de ar, o estresse proveniente do sistema de agitação também deve ser considerado. Em biorreatores agitados, a distribuição de campos de velocidade de fluido e, consequentemente, as tensões cisalhantes, não são constantes e estão diretamente relacionados à velocidade de rotação do impelidor. A maior dissipação de energia e, portanto, as maiores forças cisalhantes, ocorrem na região do impelidor. Nesta região, que representa aproximadamente 1% do volume total do reator, ocorre uma dissipação de 30 a 60% da energia total (ALOI; CHERRY, 1996).

Existem diversos tipos de impelidores que podem ser utilizados em processos com células animais. De forma geral, os impelidores podem ser classificados de três formas, de acordo com o perfil de fluxo que é estabelecido com o movimento do mesmo. O fluxo pode ser axial, radial ou uma combinação dos dois (Figura 3.7). O fluxo radial ocorre quando o impelidor empurra o fluido em direção à parede do biorreator, este movimento apresenta melhores resultados em termos de homogeneidade do sistema, mas pode originar forças cisalhantes mais severas. O fluxo axial, por sua vez, se caracteriza pelo movimento do fluido na direção do eixo do impelidor. O sentido do movimento (para cima ou para baixo) será definido pela orientação do impelidor e pela direção do movimento do eixo de agitação (MIRRO; VOLL, 2009).



Figura 3.7 - Representação dos modelos de fluxo radial e axial obtido por impelidores em biorreatores para cultivo de células animais. Fonte: Mirro e Voll (2009).

O impelidor de fluxo radial mais utilizado é o do tipo *Rushton* (Figura 3.8a), enquanto que os impelidores de fluxo axial mais amplamente difundidos em processos com células animais são os impelidores do tipo *3-blade segment, Marine* e 2-*Pitched-blade* (Figuras 3.8b, 3.8c e 3.8d, respectivamente).



Figura 3.8 - Exemplos de impelidores comumente utilizados em cultivos com células animais. Impelidores (a) tipo *Rushton*; (b) 3-blade segment; (c) Marine; e (d) 2-pitched blade.

3.3.4 Modos de operação de biorreatores

Tradicionalmente, os modos de operação de um biorreator são classificados em quatro tipos: batelada, batelada alimentada (*fed-batch*), contínuo e perfusão (contínuo com reciclo). Em um processo industrial, a tomada de decisão referente ao modo de operação do biorreator depende de alguns fatores (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008), dentre os quais: (a)

características da linhagem utilizada, como a estabilidade de expressão do produto, resistências à subprodutos inibitórios e ao cisalhamento; (b) a demanda do mercado pelo produto, o que determinará a escala de produção; e (c) a experiência técnica das equipes responsáveis pelo desenvolvimento de processo e por assuntos regulatórios.

O cultivo em batelada é operado a volume constante e sem adição de nutrientes após o início do cultivo. Neste tipo de operação, o crescimento exponencial é interrompido por limitação de substratos ou por inibição causada pelo acúmulo de subprodutos. Por sua simplicidade, é o tipo de cultivo mais utilizado para avaliar os efeitos de meios de cultura e de parâmetros de cultivo no crescimento celular, formação de produtos e no metabolismo celular. No entanto, devido à sua baixa produtividade, este modo de operação é pouco utilizado em sistemas de produção industriais (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008; MA; MOLLET; CHALMERS, 2006).

A operação em modo batelada alimentada consiste em alimentar o cultivo com os substratos essenciais, mantendo suas concentrações baixas no biorreator de forma a limitar a velocidade de consumo dos mesmos e, assim, diminuir a produção de subprodutos inibitórios ao sistema (LJUNGGREN; HÄGGSTRÖM, 1990; MA; MOLLET; CHALMERS, 2006). Este tipo de cultivo tem sido amplamente aplicado na produção de proteínas recombinantes e anticorpos medicinais utilizando linhagens de BHK (LENAS et al., 1997), CHO (ALTAMIRANO et al., 2004), HEK-293 (KYUNG; HU, 1995), entre outras.

Para ilustrar a evolução dos processos utilizando células animais, Wurm (2004) mostra uma comparação entre dois processos para produção de anticorpos recombinantes em células CHO, em escala de 10 litros, sendo um, real, de 2004, e o outro, hipotético, de 1986, ambos da empresa Lonza Biologics (Slough, Inglaterra). No processo de 1986, considerava-se uma batelada com duração de aproximadamente 7 dias, que atingiria concentração celular máxima de 1 a 2×10^6 cel/mL e produtividade específica de 10 a 20 pg/(cel.dia). A concentração final do anticorpo seria de 50-100 mg/L. No processo de 2004, utilizou-se uma batelada alimentada, que durou 21 dias e operou com densidade celular máxima de 1 a 5×10^7 cel/mL, atingindo produtividade específica na faixa de 50 a 90 pg/(cel.dia). A concentração final do anticorpo ficou entre 1 a 5 g/L. Estas mudanças se devem à meios de cultura mais eficientes e, principalmente, ao desenvolvimento de bioprocessos com estratégias de alimentação, que resultam em concentrações maiores de células que se mantém viáveis por períodos de tempo mais extensos (HACKER; DE JESUS; WURM, 2009).

O interesse na utilização de processos contínuos, com ou sem reciclo de células, é eliminar continuamente subprodutos com potencial inibidor e retirar a proteína de interesse do meio de cultura de forma que, esta não fique exposta por períodos extensos a proteases e outros fatores que podem ocasionar na sua degradação, como a temperatura, pH, etc.

No cultivo contínuo com reciclo (perfusão), utiliza-se um sistema de retenção celular com a finalidade de manter as células dentro do biorreator possibilitando assim, atingir altas densidades celulares. De modo geral, a operação em perfusão é caracterizada por: (a) ser um processo mais complexo; (b) apresentar maior risco de contaminação bacteriana, por consistir em um sistema aberto que opera por longos períodos; (c) apresentar maior produtividade volumétrica; e (d) maior concentração de produto devido à maior concentração celular obtida (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO, 2008; MA; MOLLET; CHALMERS, 2006).

Os principais sistemas de retenção celular utilizados em cultivos em perfusão são (CASTILHO; MEDRONHO, 2008):

- sedimentadores gravitacionais Separação com base na ação gravitacional. São equipamentos simples, mas que apresentam problemas relacionados ao elevado tempo de residência das células em ambientes em condições subótimas de temperatura e oxigênio dissolvido;
- centrífugas Podem ser classificadas em tubulares, de múltiplos passes e de disco. Apresentam alta eficiência de separação, porém apresentam alguns problemas como o custo, existência de partes móveis que dificultam a manutenção da esterilidade, adesão celular em seu interior e consequente entupimento de canais, e operação com forças cisalhantes elevadas;
- hidrociclones Utilizam um princípio semelhante ao das centrífugas para operação, com a vantagem de apresentam menores níveis de cisalhamento e não apresentarem partes móveis que dificultam a manutenção da esterilidade;
- filtração Podendo ser feita por filtros tangenciais ou de malha rotativa (*spinfilters*), sendo que estes últimos podem estar localizados interna ou externamente ao biorreator. O entupimento do filtro é o principal problema associado à operação destes filtros e, em alguns casos, como na utilização de *spinfilters* internos, o entupimento do filtro pode determinar o fim do cultivo.

Este modo de operação tem sido utilizado com diversas linhagens celulares na produção de anticorpos monoclonais (CLINCKE et al., 2011; DALM et al., 2005; FENG, 2006),

vacinas (TRABELSI et al., 2005) e proteínas recombinantes, como fatores de coagulação (CHU; ROBINSON, 2001; LUSHER; SCHARRER, 2009; NIVITCHANYONG et al., 2007), vetores adenovirais (HENRY; PERRIER; KAMEN, 2005) e outros (JARDON et al., 2012).

Como exemplo, em cultivo de células Vero, em microcarregadores, para produção de vírus rábico, Trabelsi et al. (2005) compararam os resultados obtidos em cultivos em batelada e perfusão. O cultivo operado em perfusão apresentou concentração celular duas vezes maior que no cultivo em batelada e a produção de lactato foi, em média, 70% menor.

3.4 Metabolismo celular

Os principais nutrientes em cultura de células de mamíferos são a glicose (fonte de carbono) e a glutamina (fonte de carbono e nitrogênio). Em geral, as células cultivadas *in vitro* apresentam um metabolismo altamente desregulado quando comparadas às mesmas células *in vivo*. Este metabolismo é usualmente caracterizado por altas velocidades de consumo das fontes de carbono e nitrogênio. Este consumo elevado resulta na produção de metabólitos com potencial inibitório ao cultivo, como o lactato e o amônio, e à produção de alguns aminoácidos, como a alanina, glicina e aspartato (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008; GÓDIA; CAIRÓ, 2006).

A membrana citoplasmática é impermeável a moléculas polares como a glicose. Desta forma, as células de mamíferos devem utilizar transportadores protéicos específicos para incorporar a glicose ao seu interior. Na maior parte das células animais, o mecanismo de transporte utilizado é a difusão facilitada, que é caracterizada por ser saturável, bidirecional e controlada pelo gradiente de concentração através da membrana plasmática. Uma vez que, normalmente, a concentração de glicose livre no citosol é muito baixa, devido à sua rápida fosforilação por hexoquinases, o transporte ocorre em direção ao interior da célula (AMABLE; BUTLER, 2008).

Ao ser consumida, a glicose é rapidamente fosforilada por hexoquinases para produzir glicose 6-fosfato, o qual pode ser transformada por duas vias principais: a glicólise e a via das pentoses (Figura 3.9). Na glicólise, a glicose 6-fosfato passa por uma série de reações até ser convertida em piruvato. Neste processo, produz duas moléculas de ATP, duas de NADH e três precursores intermediários (Frutose 6-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato e 3- fosfoglicerato) para as reações de biossíntese. Na via das pentoses, não há a formação de molécula de ATP ou de NADH. No entanto, são gerados equivalentes de redução de NADPH e mais um precursor de reações de biossíntese, a ribose-5-fosfato. Este componente pode ser convertido

em frutose-6-fosfato ou em gliceraldeído-3-fosfato, dois componentes – chaves da glicólise. Esta flexibilidade metabólica permite à célula balancear os fluxos através das duas vias.

Em cultivos com disponibilidade de oxigênio, o piruvato produzido na via glicolítica reage com a coenzima A, produzindo Acetil-CoA e CO₂. Em seguida, o Acetil-CoA, inicia uma série de reações, localizadas no interior da mitocôndria. O conjunto destas reações é denominado ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e é responsável por gerar a maior parte da energia metabólica, além de produzir outros precursores essenciais para o anabolismo celular.

De acordo com Neermann e Wagner (1996), em linhagens de BHK cultivadas em meios suplementado com soro de bezerro e isento de soro, respectivamente 62% e 75% da glicose utilizada pela célula passa pela via glicolítica, enquanto que 4,8% e 4,9%, respectivamente, é metabolizada na via das pentoses e apenas 0,4% e 0,36%, respectivamente, pelo TCA. Com estes dados, é possível estimar que aproximadamente 32% da glicose consumida em cultivos com soro e 18% em cultivos sem soro é utilizada em outras vias, como no metabolismo de lipídeos ou glicosilação de proteínas. Neermann e Wagner (1996) também relatam que a atividade das enzimas piruvato desidrogenase e piruvato carboxilase, que conectam a via glicolítica ao TCA, são insignificantes em linhagens de células BHK e CHO.



Figura 3.9 - Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato. Fonte: Altamirano, Godia e Cairó (2008).

Devido a esta ineficiência metabólica entre a via glicolítica e o TCA, existe uma tendência de acúmulo de lactato em cultivos de células de mamíferos. Este acúmulo tende a acidificar o meio de cultura e, mesmo em cultivo com controle de pH, o excesso de lactato tem efeito tóxico (HASSELL; GLEAVE; BUTLER, 1991; LAO; TOTH, 1997). Em geral, o acúmulo deste subproduto é um fator crítico no processo, especialmente quando se opera em alta densidade celular.

Goudar et al. (2010) reportaram que, em células CHO mantidas em perfusão com altas concentrações de glicose (aproximadamente 5 g/L), aproximadamente 50% da glicose consumida é convertida em lactato e o restante é utilizado para a produção de biomassa e energia. Este comportamento de converter a maior parte da glicose consumida em lactato, sob condições de disponibilidade de oxigênio é semelhante ao Efeito Warburg, também conhecido como glicólise aeróbia, observado principalmente em células cancerígenas, seja *in vivo* ou *in vitro*. Este comportamento também é observado em leveduras, e é conhecido como Efeito Crabtree, no qual o metabolismo é caracterizado por altos fluxos da via glicolítica, mas cuja respiração e fosforilação oxidativa são inibidos pela presença de glicose. Como consequência, tem-se uma elevada produção de piruvato (ANTONE, 2012; DIAZ-RUIZ; RIGOULET; DEVIN, 2011). Ambos os comportamentos são resultantes de uma rede metabólica altamente desregulada

O cultivo de células com baixas concentrações de glicose é uma alternativa para aumentar a eficiência de consumo deste substrato e, consequentemente, reduzir a produção de lactato (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008). Altamirano et al. (2000, 2001) também mostram que, em cultivos com concentrações limitantes de glicose apresentam menor velocidade específica de consumo deste substrato e observam que o fator de conversão de glicose a lactato diminui de 1,95 para 0,2, quando passa de uma condição de excesso para limitação de glicose. Também já foram reportadas situações nas quais se observa o consumo de lactato quando a glicose atinge uma concentração limitante (ALTAMIRANO et al., 2004; OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992; TSAO et al., 2005), o que mostra que o lactato gerado a partir do consumo de glicose pode ser convertido de volta a piruvato, o qual entra no TCA.

Assim como a glicose, a glutamina é uma das principais fontes de energia. Além disso, é uma fonte de nitrogênio essencial para a síntese de purinas e pirimidinas, açúcares aminados, NAD e asparagina. A glutamina é incorporada às células mediante diferentes sistemas de transporte de aminoácidos, os quais podem ou não ser facilitados, e que não são específicos para a glutamina, mas que participam da incorporação de uma série de aminoácidos relacionados (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008; GÓDIA; CAIRÓ, 2006).

A via metabólica percorrida pela glutamina é conhecida como glutaminólise e é iniciada por uma reação catalisada pela glutaminase, na qual a glutamina perde um amônio e é convertida a glutamato (Figura 3.10). Em seguida, o glutamato, pela ação da glutamato desidrogenase, perde outro íon amônio e é convertido a α -cetoglutarato, o qual entra no TCA. A partir deste ponto, o metabolismo pode seguir duas vias distintas. A glutamina metabolizada pode ser completamente oxidada a CO₂, através da ação das enzimas málica mitocondrial e málica citosólica, ou parte do esqueleto carbônico da glutamina pode sair da mitocôndria na forma de malato para ser, posteriormente, convertida a piruvato (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008; AMABLE; BUTLER, 2008).

Alternativamente, o glutamato gerado pela ação da glutaminase pode seguir a via das aminotransferases, na qual também há a geração de α-cetoglutarato. No entanto, o amônio liberado pelo glutamato é transferido ao oxaloacetato para formar aspartato (pela via aspartato aminotransferase), ou ao piruvato para formar alanina (pela via alanina aminotransferase). Estas vias são alternativas utilizadas pelas células para balancear a produção interna de amônio e de lactato (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008).



Figura 3.10 - Esquema do metabolismo de glutamina vinculado ao ciclo de Krebs. Fonte: Altamirano, Godia e Cairó, 2008.

Petch e Butler (1994) relataram que, em uma cultura de hibridomas murinos, 55% da glutamina consumida era direcionada para a formação de alanina. Em cultivos de BHK, Neermann e Wagner (1996) mostram que a enzima aspartato aminotransferase possui a maior atividade dentre as enzimas relacionadas ao metabolismo de glutamina, isto também foi observado por Street et al. (1993) em células HeLa e CHO. Estes resultados sugerem que, em células de mamíferos, a glutamina é parcialmente oxidada no TCA, até a formação de malato ou oxaloacetato para, em sequência, ser metabolizada por uma das vias das aminotransferases (NEERMANN; WAGNER, 1996; PETCH; BUTLER, 1994).

Estudos também mostram que, em células de mamíferos, a atividade da glutaminase é menor que da glutamato desidrogenase (NEERMANN; WAGNER, 1996; STREET et al., 1993). No entanto, Neermann e Wagner (1996) observaram que a atividade da glutaminase era pelo menos três vezes superior à taxa de consumo de glutamina em células BHK, CHO e hibridomas, o que sugere que o transporte de glutamina para o interior da célula é o fator limitante no consumo deste aminoácido.

Em meio de cultura, a glutamina geralmente é utilizada em concentrações na faixa de 1 a 5 mM (aproximadamente 146 a 730 mg/L), que são pouco mais elevadas que a média das concentrações dos outros aminoácidos. Estas concentrações também estão um pouco acima do mínimo requerido para manter a viabilidade celular. Como consequência disso, tem-se a produção desregulada de amônio, um subproduto tóxico, além do consumo ineficiente de glutamina (AMABLE; BUTLER, 2008).

Os efeitos tóxicos do amônio podem ocorrer de duas formas distintas. A primeira está relacionada à perturbação do pH intracelular. A metabolização da glutamina gera íons amônio na mitocôndria cuja membrana interna é extremamente impermeável a íons. Porém, o íon amônio é convertido a gás amônia e sai da mitocôndria para o citoplasma. Esta migração de amônia para o citoplasma causa uma redução no pH mitocondrial, devido ao próton deixado nesta organela (Figura 3.11). Além disso, a amônia pode se difundir para o meio de cultura, mas a ação de proteínas carreadoras podem trazê-la de volta ao citoplasma na forma de íons amônio. A consequência deste ciclo é a acidificação do citoplasma e da matriz mitocondrial e a alcalinação do meio de cultura (AMABLE; BUTLER, 2008).

Outro efeito é a participação do amônio em reações enzimáticas e na alteração de seus equilíbrios. A fosfofrutoquinase e a α -cetoglutarato desidrogenase, enzimas-chave para a via glicolítica e o TCA, respectivamente, podem ser ativadas pela presença de íons amônio, que

em altas concentrações pode causar altas taxas de glicólise e produção de lactato e baixar a atividades do ciclo do TCA (AMABLE; BUTLER, 2008).



Figura 3.11 - Alteração do pH intracelular devido à formação de amônia. Fonte: Amable e Butler (2008).

Estudos mostram que concentrações de amônio próximas a 2mM (34 mg/L) inibem o crescimento de células BHK e hibridomas (CRUZ et al., 2000; OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992). De acordo com Hassell, Gleave e Butler (1991), linhagens de células HeLa e BHK são extremamente sensíveis à produção de amônio, sofrendo reduções de 50% na produção celular em concentrações de 0,8 e 1,3 mM (13,6 e 22,1 mg/L), respectivamente. Ljunggren e Häggström (1990) mostraram que cultivos em batelada alimentada de células Sp2/0 com baixas concentrações de glutamina reduzem o fator de formação de amônio por célula ($Y_{NH4/X}$) em aproximadamente 50%.

O acúmulo de amônio também tem efeitos na produção de proteínas. A literatura mostra que o padrão de glicosilação de proteínas está relacionado à concentração de amônio presente no meio (JENKINS; CURLING, 1994). Borys, Linzer e Papoutsakis (1994) mostraram que células CHO transfectadas para produzir a proteína lactogênio-I de placenta de rato, quando cultivadas em condições com altas concentrações de amônio, expressavam grandes quantidades de proteína não-glicosilada, o contrário do observado em condições com baixas concentrações de NH₄⁺. Yang e Butler (2000) também mostraram que altas concentrações de amônio podem inibir a complexidade de cadeias de oligossacarídeos N-lincados e a sialilação da eritropoietina produzida em células CHO. Isto ocorre, principalmente, pois o amônio inibe a atividade de enzimas de glicosilação específicas presentes no Complexo de Golgi. O consumo de glicose e glutamina e a sua utilização nas vias metabólicas depende diretamente da linhagem celular estudada. Reitzer,Wice e Kennell (1980) mostraram que, em células HeLa, a glicose tem papel essencial no anabolismo celular e, em menor escala no catabolismo. Já em cultivos de hibridomas, a glicose é a principal fonte de energia, enquanto que apenas 28% do ATP produzido pelas células está relacionado ao consumo de glutamina (BARNABÉ; BUTLER, 2000). Fitzpatrick, Jenkins e Butler (1993), por outro lado, mostraram que, em hibridomas advindos de linfócitos B, os efeitos da glicose e da glutamina no fornecimento de energia são semelhantes.

Além da glutamina, os aminoácidos, de forma geral, também são fontes de nitrogênio e tem papel essencial na biossíntese de proteínas estruturais e enzimas (SEN; ROYCHOUDHURY, 2013). Em células em fase exponencial de crescimento, os aminoácidos são principalmente utilizados no anabolismo celular. Quando o crescimento celular decai, ou alguma fonte de energia se torna limitante, o consumo de aminoácidos é redirecionado e passa a ser utilizado principalmente no catabolismo celular (LU et al., 2005).

Na maioria dos casos, os aminoácidos podem ser divididos em três grupos. Primeiro, o grupo daqueles que são rapidamente consumidos: a valina, isoleucina, leucina, lisina e cisteína. Em segundo, têm-se os aminoácidos que são consumidos em baixa proporção, que são a treonina, arginina, fenilalanina, serina, histidina, metionina e glicina. Por fim, o último grupo constitui-se de aminoácidos que são produzidos e secretados pelas células em diferentes condições de cultivo e estado fisiológico celular: alamina, prolina, aspartato, asparagina e glutamato (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008).

O ciclo de Krebs é a principal via de oxidação e síntese da maior parte dos aminoácidos e, também, é a principal via pela qual os carbonos dos aminoácidos são direcionados para outras moléculas menores (Figura 3.12).

A literatura mostra que, em cultivos de hibridoma, a suplementação de meios com aminoácidos pode resultar no aumento da viabilidade celular (DUVAL et al., 1991) e na diminuição do efeito de morte celular induzida pela apoptose (DUCOMMUN et al., 2001). Outros efeitos são o aumento do crescimento celular (LUAN; MUTHARASAN; MAGEE, 1987) e da produtividade de anticorpos monoclonais (DUCOMMUN et al., 2001). De maneira geral, a limitação de aminoácidos extracelulares afeta o *pool* de aminoácidos intracelulares o que, consequentemente, influencia toda a rede metabólica no que se refere ao crescimento celular e à produção da proteína de interesse (SEEWOSTER; LEHMANN, 1995).

Outro componente que deve ser considerado no metabolismo celular é o oxigênio. Apesar de não participar efetivamente das reações enzimáticas, ele atua como receptor final de elétrons na cadeia respiratória, sendo reduzido a água e permitindo a re-oxidação de coenzimas que participam de reações de desidrogenação ao longo da via glicolítica e do TCA. Além disso, o oxigênio tem papel importante na oxidação de lipídeos a Acetil-CoA.

Em geral, cultivos de células de mamíferos são feitos em uma faixa de 30 a 60% de oxigênio dissolvido. Apesar da sensibilidade à concentração de oxigênio variar de acordo com a linhagem utilizada, sabe-se que condições com baixa disponibilidade de oxigênio são prejudiciais ao crescimento celular. Da mesma forma, concentrações elevadas de O₂ causam danos oxidativos (AMABLE; BUTLER, 2008).



Figura 3.12 - Fluxos de entrada e saída de aminoácidos no ciclo de Krebs em células de mamíferos. Fonte: Amable e Butler (2008).

Vriezen et al. (1997) mostraram que, em células de mieloma de rato Sp2/0.Ag14, as velocidades específicas de consumo de glicose e de produção de lactato e amônia foram maiores em condições com baixa concentração de oxigênio dissolvido. Seguindo uma linha semelhante, Ogawa et al. (1992) mostraram que, ao reduzir o pO₂ de 5 para 0,5% em cultivos de hibridoma, observava-se quedas de até 90% nos valores de produtividade específica de

MAb, e aumentos de até 70% nas velocidade específicas de consumo de glicose e de produção de lactato.

Os níveis de oxigênio dissolvido também podem afetar a glicosilação de proteínas. Kunkel et al. (1998) mostraram que a adição de galactoses terminais a um anticorpo monoclonal foram reduzidas em 60% quando a concentração de oxigênio dissolvido foi reduzida de 100% para 10%.

3.5 Fator de coagulação VIII

3.5.1 Coagulação sanguínea

A coagulação é uma série complexa de interações, nas quais o sangue perde suas características de fluido, sendo convertido em massa semi-sólida, formando um coágulo irreversível, pela interação do tecido lesado, plaquetas e fibrina (Figura 3.13).



Figura 3.13 - Esquema de ruptura da parede vascular e formação do coágulo. Fonte: Informedica (2013).

Essa coagulação é responsável por diversas reações químicas, envolvendo principalmente um grupo específico de proteínas plasmáticas, denominadas fatores de coagulação.

Em 1964, Macfarlane, Davie e Ratnoff propuseram o primeiro modelo da "cascata de coagulação" para explicar a fisiologia da coagulação sanguínea. Neste modelo, a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica, sequencial de zimógenos (precursores enzimáticos inativos), por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, converte a molécula de fibrinogênio em fibrina. O esquema divide a coagulação em duas vias, uma via extrínseca e uma via intrínseca, que convergem no ponto de ativação do fator X, na chamada "via final comum" (FRANCO, 2001).

A via intrínseca começa com a ativação da calicreína, pelo contato com superfícies anormais produzidas pela lesão. A via extrínseca é disparada pelo trauma, que ativa o fator VII (FVII). Uma característica notável desse processo é que a forma ativada de um fator de coagulação catalisa a ativação do fator seguinte.

Na figura 3.14, pode-se observar que na via extrínseca, o fator VII plasmático é ativado na presença de seu cofator, o fator tecidual (FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT), responsável pela ativação do fator X. Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-calicreína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativado, ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado por traços de trombina, e em presença de íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X na via final comum, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (FERREIRA et al., 2010). O papel das plaquetas na coagulação era considerado independente das 2 vias (PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007). Apesar deste modelo possuir limitações e não conseguir explicar satisfatoriamente todos os fenômenos ligados à hemostasia *in vivo*, foi aceito por quase cinquenta anos (FERREIRA et al., 2010).



Figura 3.14 - Modelo de "cascata de coagulação" proposto por Macfarlane, Davie e Ratnoff. Fonte: Hepcentro (2013)
Recentemente foi proposto o modelo baseado em superfícies celulares, no qual a hemostasia requer substâncias pró-coagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina (FERREIRA et al., 2010; PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007). As alterações propostas pelo modelo atual são respaldadas na principal falha do modelo anterior: não explicar por que os indivíduos com coagulopatias que apresentam apenas uma das vias afetadas, extrínseca ou intrínseca, não conseguem ter uma coagulação normal compensada pela via não afetada.

O entendimento atual do processo hemostático considera a inter-relação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que atuam em uma série de estágios ou fases, e não em duas vias (intrínseca e extrínseca) como antes. As fases de iniciação, amplificação, propagação e finalização ilustram o intrigante processo que garante a circulação do sangue na forma líquida, restrita ao leito vascular. Estas quatro fases estão resumidas na figura 3.15 e compreendem a atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares.

Na primeira fase, é proposto que o processo é iniciado no local da injúria por células que expressam FT e que estão fora do sistema circulatório. Na sua superfície, FVII ativado (FVIIa) complexado com FT ativa os fatores IX e X. O FXa, por sua vez, se associa ao fator V formando o complexo de protrombinase na superfície celular. Em contrapartida, o FIX ativado (FIXa) se liga à superfície de plaquetas. Nessa fase inicial ocorre pequena formação de trombina e a coagulação passa para a fase de amplificação somente quando a lesão possibilita que plaquetas, fator VIII (FVIII) e fator de von Willebrand (FvW) passem para o meio extravascular e se liguem às células FT.

Na fase de amplificação, a pequena formação de trombina ocorrida na fase inicial ativa plaquetas, expondo receptores e sítios de ligação a fatores ativados. Além disso, há ativação de fatores VIII, XI e V. Nesse estágio, a liberação do FvW, antes complexado com o FVIII, possibilita maior adesão e agregação plaquetária promovidas por essa molécula. Na última fase, de propagação, vários eventos ocorrem na superfície das plaquetas: ligação do FIX ao FVIII, dissociação do FX antes ligado ao FV e formação do complexo tenase (FVIII/FIX/FX). Nesse momento, ocorre grande formação de trombina, o que possibilita a formação do coágulo de fibrina.



Figura 3.15 - Novo modelo da teoria da coagulação, baseada em superfícies celulares. Fonte: Ferreira et al. (2010).

Nesse contexto, pode-se perceber a importância dos diversos fatores de coagulação e mensurar os problemas causados pela ausência de apenas um deles. A falta de algum fator no organismo é causa de diversas coagulopatias. Entre as mais conhecidas podemos destacar a hemofilia A, causada pela deficiência quantitativa ou funcional do FVIII; a hemofilia B causada pela deficiência de FIX; e a doença de Von Willebrand, causada pela deficiência de FvW. São consideradas coagulopatias raras as deficiências de fatores I, II, V, VII, X e XIII.

3.5.2 Fator VIII – A estrutura da proteína

A identidade molecular do FVIII permaneceu desconhecida até o início dos anos 80, quando a proteína foi purificada e o cDNA da molécula foi clonado. O FVIII é codificado pelo gene F8 e sintetizado principalmente no fígado. A proteína madura contém 2332 aminoácidos e seu peso molecular estimado é de 265 kDa.

A molécula do FVIII possui algumas características como seu elevado tamanho e alta complexidade, quando comparada a outras proteínas recombinantes. No entanto, a atividade da molécula é o ponto principal, pois está relacionada à presença de vários domínios distintos e apresenta alta sensibilidade à degradação tanto química, quanto física.

Herlitschka et al. (1998) mostraram que o rFVIII produzido em cultivos de clones recombinantes de SkHep-1 a 28 °C apresenta atividade 4 vezes maior que aquele produzido em cultivo a 37 °C. Outros estudos mostram que a molécula de FVIII B deletado é completamente desnaturada em condições com pH abaixo de 6 (FATOUROS; OSTERBERG; MIKAELSSON, 1997).

O FVIII é constituído de vários domínios com homologia interna: os três primeiros domínios da porção N-terminal, A1 (1-329), A2 (380-711) e A3 (1649-2019) apresentam homologia na sequência de aminoácidos de aproximadamente 30%. Os domínios A2 e A3 são separados pelo domínio B (740-1648). Na porção C-terminal da proteína madura há dois domínios homólogos: C1 (2020-2172) e C2 (2173-2332) (Figura 3.16).



Figura 3.16 - Representação esquemática do heterodímero do FVIII. Fonte: Bowen (2002).

O FVIII circula no plasma associado ao fator de von Willebrand (FvW) via domínio C2, na forma de heterodímero. O heterodímero consiste em duas porções distintas. A primeira, denominada cadeia pesada (HC- *Heavy Chain* - domínios A1-A2 e uma região variável do domínio B) e segunda denominada cadeia leve (LC – *Light Chain* - domínios A3-C1-C2), que estão associadas via interação de um íon metal. Esse heterodímero requer ativação proteolítica para produzir a forma do cofator ativado, FVIIIa (FAY et al., 2001; LACROIX-DESMAZES, 2008; LENTING; VAN MOURIK; MERTENS, 1988) (Figura 3.17). Como resultado da proteólise, durante a cascata de coagulação sanguínea, ocorrem clivagens nas cadeias leve e pesada.

A interação com FvW facilita essas clivagens e a ativação do FVIII pela trombina. Ambos, trombina e FXa ativam o FVIII, sendo que o FXa tem 20% da eficiência catalítica da trombina (LOLLAR; PARKER; TRACY, 1988). Após ativação, o FVIII é liberado do FvW e se liga ao FIX ativado e a fosfolipídios de membrana para formar o complexo ativador do FX.



Figura 3.17 - Representação esquemática do FVIIIa. Fonte: Bowen (2002).

O domínio B representa 40% da massa do FVIII, não apresenta homologia a nenhuma outra proteína conhecida e contém 18 dos 25 sítios de glicosilação do FVIII. Moléculas nas quais o domínio B foi parcial ou totalmente deletado apresentam atividade de coagulação específica similar a moléculas íntegras e maior estabilidade. Além da função de peptídeo de ativação extremamente grande, o domínio B não apresenta nenhuma outra função importante conhecida e não parece participar da atividade pró-coagulante (FAY et al., 2001; KAUFMAN; WASLEY; DORNER, 1988; LACROIX-DESMAZES, 2008; LENTING; VAN MOURIK; MERTENS, 1988). Estudos utilizando esse tipo de construção, isto é, com o domínio B parcial ou completamente deletado para a expressão direta de moléculas de FVIII totalmente funcionais estão disponíveis na literatura (ERIKSON et al., 2001; HERLITSCHKA et al., 1998; PICANÇO et al., 2007; PIPE, 2008). Picanço et al. (2007) relatou que a expressão da proteína chega a ser de 2 a 10 vezes maior quando comparado à expressão da molécula de FVIII intacta. Este aumento da expressão é resultado de aumentos notórios dos níveis de mRNA e o aumento da tradução da proteína (PIPE, 2008).

3.5.3 Hemofilia A

A Hemofilia é uma doença genético-hereditária recessiva, que tem como principal característica o retardo no tempo de coagulação do sangue e manifesta-se quase exclusivamente no sexo masculino.

Deficiências genéticas e um distúrbio autoimune raro podem causar a diminuição da atividade dos fatores de coagulação do plasma sanguíneo, de modo que comprometem a coagulação sanguínea. A deficiência ou disfunção do FVIII e FIX compromete a ativação do FX, então todos os demais passos do processo de coagulação (Figura 3.15) ficam comprometidos e o depósito da fibrina fica ineficiente ou inexistente. Não é de se surpreender

que os distúrbios ligados a estes dois fatores sejam clinicamente similares, pois ambos estão ligados ao mesmo passo essencial no processo de geração da fibrina (BOWEN, 2002).

A deficiência da atividade do FVIII, a Hemofilia A, é transmitida através dos cromossomos sexuais XX. Quando a mulher é a portadora, transmite para os filhos homens, que normalmente desenvolvem a doença. Já os homens só transmitem a doença para as filhas mulheres, que normalmente são portadoras da hemofilia sem manifestar a doença. Porém, poderão transmitir a doença a um filho do sexo masculino, no qual está poderá se manifestar. A doença ocorre mundialmente em 1 a cada 5.000 a 10.000 nascimentos masculinos e está relacionada a 75 a 80% dos casos de hemofilia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O tratamento da hemofilia A só é possível através da reposição do fator VIII, o qual pode ser obtido diretamente através de derivados do plasma sanguíneo ou de proteínas recombinantes, as quais atualmente são obtidas através de linhagens celulares de murinos (MIAO et al., 2004). No Brasil, estima-se a existência de 7.000 hemofílicos, cujo tratamento é realizado utilizando exclusivamente derivados de plasma sanguíneo e tem um gasto de aproximadamente 100 milhões de dólares anuais (PICANÇO et al., 2004; ROSA et al., 2012).

O tratamento por reposição do fator VIII começou a ser aplicado em meados da década de 1960, quando se desenvolveu o crioprecipitado (concentrado precipitado a frio do fator VIII), que possibilitou o isolamento desta proteína do plasma de pessoas sadias. No entanto, nas décadas subsequentes, a obtenção do fator a partir do plasma humano começou a trazer riscos significativos de transmissão do vírus HIV e das hepatites B e C. Além disso, a disponibilidade do fator VIII era limitada e insuficiente para todos os pacientes (ERIKSON et al., 2001).

Medidas profiláticas contra a hemofilia são dispendiosas e só são possíveis se recursos suficientes forem alocados ao tratamento desta doença. Manco-Johnson et al. (2007) estimaram que, considerando um preço de US\$ 1 por unidade de rFVIII, o custo da profilaxia para uma criança pesando 50 kg atingiria US\$ 300.000,00 anuais. Nos EUA, 54,4% dos pacientes com hemofilia estão em regime profilático e destes, 80% utilizam produtos recombinantes (CDC, 2013).

Por outro lado, o custo médio do tratamento curativo é muito mais baixo e varia dependendo da severidade da doença, peso do paciente e custo dos produtos utilizados. Nos EUA, a mediana do custo de tratamento curativo para uma pessoa com hemofilia é de US\$ 73.548 anuais (GUH et al., 2011).

3.5.4 Produção de fator VIII em células animais

A utilização do fator VIII produzido a partir de organismos modificados geneticamente surgiu como uma alternativa mais segura ao fator VIII originário do plasma sanguíneo. Devido às numerosas modificações pós-traducionais do fator VIII, sua produção deve ser feita em células de mamíferos, para que sua atividade coagulante seja efetiva (PIPE, 2008). Um dos principais obstáculos relacionados à produção do fator VIII recombinante é o fato da expressão desta proteína ser de duas a três vezes mais baixa quando comparada com a expressão de outras proteínas complexas em sistemas de expressão heterólogos (SELVARAJ et al., 2011).

Apesar da ampla disponibilidade de produtos recombinantes existentes, o custo destes produtos ainda é muito alto (KOLIND et al., 2011). Este problema pode ser amenizado utilizando não apenas métodos de produção mais eficientes, mas também se estabelecendo linhagens com maiores níveis de expressão. Atualmente, os produtos de rFVIII disponíveis comercialmente utilizam células de murinos (CHO ou BHK) construídas a partir de vetores plasmidiais (SPENCER et al., 2011). Células CHO, particularmente, possuem baixa atividade proteolítica, característica importante para a produção do rFVIII intacto (ADAMSON, 1994). No entanto, transfecções feitas com genes não-virais são menos eficientes que aquelas feitas com vetores virais (NISHIKAWA; HUANG, 2001).

A utilização de células de murinos também está sujeita a questionamentos, pois estas linhagens apresentam diferentes padrões de glicosilação da proteína, o que pode causar reações imunes nos pacientes, sobretudo nos tratamentos de doenças crônicas, caso da hemofilia. Desta forma, esforços têm sido direcionados no sentido de utilizar células humanas para a produção desta proteína (MEI et al., 2006; TONN et al., 2002).

Estudos realizados com uma linhagem de células humanas SkHep construída a partir de um vetor lentiviral, pelo Hemocentro de Ribeirão Preto, atingiram altos níveis de expressão e de estabilidade *in vitro* de rFVIII, o que torna este sistema uma potencial alternativa para a produção desta proteína, que ainda precisa ser testada *in vivo* para verificar sua funcionalidade (PICANÇO et al., 2007; ROSA et al., 2012; RUSSO-CARBOLANTE et al., 2011).

Em cultivos de células animais, foi identificado que a expressão do rFVIII é limitada por diversos mecanismos (SOUKHAREV et al., 2002). Um deles está relacionado à ineficiência de expressão do mRNA de FVIII, a qual acontece principalmente por dois motivos: 1) a presença de sequências difusas (ou seja, que não tem uma localização específica no DNA) na região de codificação do FVIII, em particular na região do cDNA referente ao domínio A2, que apresentam efeito deletério ao acúmulo do mRNA e, 2) o fato do cDNA do FVIII possuir um silenciador transcripcional derivado dos exons 9 a 11 do gene de FVIII que está envolvido na inibição da expressão de mRNA do FVIII.

Outro fator é a ineficiência no transporte do fator VIII do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi durante o processo de glicosilação. Durante o processo de enovelamento, apenas proteínas com a conformação correta saem do retículo endoplasmático, enquanto que as outras são retidas por proteínas auxiliares chamadas chaperonas, que atuam como um sistema de controle de qualidade da proteína (Figura 3.18). No caso específico da secreção de FVIII, foi documentada a interação com a chaperona BiP, que controla a saída do fator VIII do retículo endoplasmático e cuja expressão está diretamente relacionada à expressão de FVIII (TAGLIAVACCA; WANG; KAUFMAN, 2000). No entanto, estudos identificaram uma região no domínio A1 do FVIII cujo enovelamento apresenta resíduos de leucina e fenilalanina, que são os aminoácidos que tem maior afinidade com a chaperona BiP. Desta forma, maiores níveis de expressão de BiP resultam em maiores níveis de inibição na secreção de rFVIII (SOUKHAREV et al., 2002).



Figura 3.18 - Esquema da atuação da chaperona no retículo endoplasmático. Fonte: Alberts et al. (2010).

Outro mecanismo está relacionado à presença do fator von Willebrand (fvW) no meio de cultura para estabilizar a proteína após a secreção. O fator von Willebrand é uma proteína de alto peso molecular e que apresenta diversas funções no processo de coagulação, sendo que uma das principais é a atuação como proteína carreadora do FVIII (KARLMAN; HOLMSTRÖM; WIMAN, 2011). Estudos in vitro demonstraram que o fvW é responsável por promover a associação entre as cadeias leve (LC) e pesa (HC) do FVIII, reconstituindo a

atividade da proteína. Nem todos os processos de produção utilizam o fvW, como será apresentado adiante, porém, uma alternativa a utilização desta proteína é a operação do cultivo em modo perfusão com baixos tempos de residência, de forma que o rFVIII produzido seja continuamente retirado do biorreator e não haja problema de degradação.

Nos cultivos iniciais para produção de rFVIII utilizava-se soro fetal bovino (SFB), mas, por diversos motivos, este componente teve de ser eliminado (item 3.3). No entanto, células cultivadas em meio sem soro apresentavam menor expressão de rFVIII (ADAMSON, 1994), principalmente pelo fator de SFB ser uma fonte de fator von Willebrand (SOUKHAREV et al., 2002). Estudos subsequentes logo mostraram que a adição de fator von Willebrand (fvW) ao meio de cultura resultavam em expressões semelhantes àquelas obtidas no cultivo em meio com 10% de SFB (KAUFMAN; WASLEY; DORNER, 1988, 1989).

A primeira geração de rFVIII humano (FRANCHINI et al., 2012) para fins comerciais começou a ser produzida no início dos anos 90, e era caracterizada pela presença de proteínas plasma derivadas no meio de cultivo e na formulação final do produto. Desta geração, foram licenciados o Recombinate da Baxter, o Kogenate da Bayer e o Helixate da CSL Behring. Em 2000, uma segunda geração de produtos rFVIII (KogenateFS/ HelixateFS e ReFacto) com aumento de pureza foi desenvolvida. Estes produtos continham proteínas derivadas do plasma apenas no meio de cultura, o que não eliminava completamente o risco de haver traços na formulação final (FRANCHINI et al., 2012).

Atualmente, a terceira geração de produtos rFVIII foi desenvolvida procurando evitar a adição de todo o tipo de proteína de origem animal e humana da cultura celular (PIPE, 2008). Várias empresas têm se envolvido no desenvolvimento e comercialização destes produtos, dentre as quais pode-se citar a Wyeth/Genetics Institute of Cambridge (ReFacto[®]), a Bayer (Kogenate[®] e Kogenate FS[®]), a Baxter (Recombinate[®], Advate[®]), Genentech Inc., Merck, Monsanto Company, Novo Nordisk Health Care AG e Octagene Gmbh, Biogen Inc.

Todos os produtos comerciais de FVIII são liofilizados devido à sua limitada estabilidade no estado líquido *in vitro*. Esta estabilidade depende de diversos fatores, incluindo temperatura, presença de íons metálicos, sais, lipídeos, outros excipientes das formulações, adsorção na superfície, pH, agitação, exposição à luz, processo de liofilização, congelamento e condições de estocagem (WANG; WANG; KELNER, 2003).

Os produtos fabricados pela Bayer são produzidos em células BHK, transfectadas por cDNA de FVIII íntegro, cultivadas em meio livre de soro bovino. A produção envolve cultivo de células em suspensão em tanque agitado operado em modo contínuo com reciclo

(perfusão), onde meio condicionado é coletado e filtrado e/ou centrifugado. De acordo com Boedeker (1992), o processo em perfusão para produção de Kogenate[®], ainda na primeira geração de produtos de rFVIII, era mantido em estado estacionário por até 6 meses. A produção do Kogenate FS[®] é caracterizada pela adição de insulina recombinante e de uma solução de proteínas de plasma humano. A formulação final não contém albumina humana, a qual é substituída por sucrose, como estabilizante da proteína de FVIII. Além disso, também foi introduzido um passo de tratamento com solventes para inativação viral (SOUKHAREV et al., 2002).

Avery, Plzak e Gass (2003) construíram um modelo matemático para simular um processo de produção de rFVIII similar àquele utilizado na produção de Kogenate FS[®], da Bayer. Neste processo, dois biorreatores de volume útil de 100 litros são operados simultaneamente em modo de perfusão. A produção é considerada ótima quando o processo atinge uma taxa de perfusão de 10 volumes por dia (equivalente a um tempo de residência de 2,4 horas). O processo de retenção celular é feito utilizando um decantador, que foi escolhido por causar menor dano celular que *spinfilters*. O decantador opera de forma que 90% das células retornem ao biorreator.

O processo de produção do Recombinate TM, da Baxter, utiliza células CHO transfectadas para produzir o rFVIII e o fator von Willebrand recombinate (rvWF). Utiliza-se um biorreator de 2.500 litros, no qual as principais variáveis de processo são controladas. Para evitar o esgotamento de nutrientes e o acúmulo de subprodutos, a cada três dias retira-se 7/8 da suspensão e adiciona-se igual volume de meio fresco. As células são retiradas juntamente com o meio metabolizado, de forma a manter uma concentração superior a 1×10^7 cel/mL no biorreator. Esta sequência é mantida por aproximadamente 60 gerações celulares (GOMPERTS; LUNDBLAD; ADAMSON, 1992).

De acordo com a literatura (ERIKSON et al., 2001; SOUKHAREV et al., 2002), o ReFacto[®], da Wyeth/Genetics Institute, é produzido em células CHO adaptadas ao cultivo em suspensão e, diferentemente dos produtos da Bayer e da Baxter, é um FVIII B-deletado e apresenta eficácia similar a outros produtos recombinantes e derivados de plasma sanguíneo. O cultivo celular é operado em modo de perfusão (contínuo com reciclo) e é utilizado um meio de cultivo que contém apenas dois componentes de origem biológica: albumina humana e insulina recombinante de *Escherichia coli*. O ReFacto AF[®], terceira geração do produto da mesma empresa, é feito com banco master de células livre de soro fetal bovino e albumina humana.

O cultivo é operado em modo de contínuo com reciclo (perfusão). A primeira fase do cultivo é voltada ao aumento da densidade celular até que se atinja um valor adequado para se iniciar fase de produção, o qual tem início com a diminuição da temperatura e do oxigênio e pela substituição do meio de cultivo por um meio contendo butirato de sódio, um componente com a capacidade de estimular a produção de proteínas através da expressão de altos níveis de mRNA e de afetar as vias de biossíntese de proteína (incluindo a enovelação e transporte), o que explica os altos níveis de expressão obtidos em cultivos com células CHO (McMURRAY-BEAULIEU et al., 2009; SUNG et al., 2004). Essas alterações mantêm as células em estado estacionário e aumentam a expressão da proteína. Células são continuamente removidas do sobrenadante utilizando centrifugação contínua e retornam ao biorreator de produção, o sobrenadante contendo produto em meio condicionado é transferido para um tanque de estocagem onde é o filtrado e purificado, através de uma série de etapas de cromotografia e uma etapa de inativação viral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens utilizadas

Os estudos foram realizados empregando duas linhagens de células humanas, transfectadas para a expressão da proteína rFVIII e provenientes do Hemocentro de Ribeirão Preto:

- a) linhagem HepG2FVIIIDB-P140K (rHepG2), construída pela Dra. Aparecida Maria Fontes, que expressaria o fator de coagulação VIII recombinante (rFVIII) B deletado, utilizando um vetor retroviral pMFG-FVIII-P140K. Esta linhagem foi posteriormente identificada como rHeLa, através de um Exame de Vínculo Genético (*STR-Fingerprint*) com análise de 10 locus (CSF1PO, D13S317, D16S539, D5S818, D7S820, F13AO1, F13B, THO1, TPOX, Vwa), o qual caracterizou o perfil de DNA e comprovou a identidade desta linhagem humana.
- b) linhagem SkHep-FVIIIGFP-CMVdelB (rSKHep), que expressa concomitantemente o fator de coagulação VIII B deletado e a proteína GFP - *Green Fluorescent Protein*, utilizando um vetor lentiviral com um promotor citomegalovírus (CMV) (PICANÇO et al., 2007).

As células foram preservadas em nitrogênio líquido, em meio de preservação, constituído de 40% de meio fresco, 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (102952, Merck, Brasil) e 50% (v/v) de soro fetal bovino (SH30532, Hyclone, EUA). Como a linhagem rHeLa foi adaptada a diferentes meios de cultura e cada condição pode ter selecionado uma subpopulação de células, foram preparados diferentes bancos de cultura para cada uma dessas subpopulações, nos referidos meios de cultura.

4.2 Meios de Cultura

Vários meios de cultura foram utilizados neste trabalho, com o objetivo de selecionar a melhor opção para a produção do rFVIII:

4.2.1.1 Formulação aberta

a) Meio 1a (DMEM10%_a): DMEM (D7777, Sigma, EUA) cuja formulação básica apresenta concentrações iniciais de 4,5 g/L de glicose, 0,584 g/L de glutamina, 0,11 g/L de ácido pirúvico, 0,015 g/L de vermelho de fenol, além de outros aminoácidos, vitaminas e sais. Este meio foi acrescido de 10% (v/v) de soro fetal bovino - SFB (SH30532, Hyclone, EUA), 2,2 g/L de HEPES (H4034, Sigma, EUA), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (S5761, Sigma, EUA) e 1 μ L/L de β -mercaptoetanol (M3148, Sigma, EUA) e foi utilizado nas adaptações das linhagens, ensaios em frascos T e *Spinner*. Nos ensaios em biorreator, a concentração de bicarbonato de sódio foi de 0,5 g/L e não foi adicionado HEPES. As linhagens estavam originalmente adaptadas a este meio;

b) Meio 1b (**DMEM5%_b):** DMEM (D7777, Sigma, EUA) acrescido de 5% (v/v) de SFB, 2,2 g/L de HEPES, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio e 1 μ L/L de β -mercaptoetanol. Este meio foi utilizado na adaptação da linhagem rSKHep em frascos T e *Spinner*. No ensaio em biorreator, a concentração de bicarbonato de sódio foi de 0,5 g/L e não foi adicionado HEPES;

c) Meio 1c (DMEM10%_c): DMEM (5030, Sigma, EUA) cuja fomulação básica não apresenta glicose, glutamina, ácido pirúvico e vermelho de fenol. Este meio foi acrescido de 10% (v/v) de SFB, 1 μ L/L de β -mercaptoetanol, 0,11 g/L de ácido pirúvico (P5280, Sigma, EUA), 0,0015 g/L de vermelho de fenol (P3532, Sigma, EUA), 0,5 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma) e de concentrações variadas de glicose (G7021, Sigma, EUA) e de glutamina (G8540, Sigma, EUA) de acordo com a condição estudada no biorreator. Este meio foi utilizado no ensaio em biorreator operado em perfusão com a linhagem rSKHep.

4.2.1.2 Formulação fechada

Meio 2 (BD10%): BD Quantum (BD 22051, BD, EUA) com 10% (v/v) de SFB, acrescido de 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). A linhagem celular rHeLa foi adaptada a este meio antes da tentativa de adaptação ao meio BD-ACF (BD, EUA).

4.2.2 Formulações isentas de SFB

4.2.2.1 Meios livres de componentes animais

a) Meio 3 (BD-ACF): *Cell MAb* (BD, EUA) acrescido de 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Este meio foi utilizado na adaptação da linhagem rHeLa;

b) Meio 4 (Si-ACF): SAFC Ex-CellTM ACF CHO Medium (C9098, SAFC Bioscience, EUA) acrescido de 0,584 g/L de glutamina (Sigma) e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Este meio foi utilizado nas adaptações das linhagens e ensaios em frasco *Spinner*. Apesar de ser uma formulação fechada, as concentrações iniciais de glicose e glutamina, 4,5 g/L e 0,466 g/L, respectivamente, foram determinadas no laboratório;

c) Meio 5 (Si-325): SAFC Ex-CellTM 325 PF CHO Medium (24340C, SAFC Bioscience, EUA) acrescido de 0,584 g/L de glutamina (Sigma) e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Este meio foi utilizado na adaptação da linhagem rHeLa.

4.2.2.2 Meios quimicamente definidos

a) Meio 6a (HyCD_a): HyClone CDM4CHOTM (SH30556, Hyclone, EUA) acrescido de 0,584 g/L de glutamina e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Este meio foi utilizado nas adaptações das linhagens, em ensaios em frascos T e *Spinner*. Nos ensaios em biorreator, a quantidade de bicarbonato de sódio (Sigma) foi de 0,5 g/L. Apesar de ser uma formulação fechada, as concentrações iniciais de glicose e glutamina, 8 g/L e 0,116 g/L, respectivamente, foram determinadas no laboratório;

b) Meio 6b (**HyCD_b**): HyClone CDM4CHOTM (RRA 114353, Hyclone, EUA) é um meio customizado, isto é, não tem glicose, glutamina, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio na sua formulação básica, que é a mesma do Meio 6a. Este meio foi utilizado em ensaios em biorreator operado em batelada ou em perfusão, onde foram adicionados 0,5 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), concentrações variadas de glicose (Sigma) e de glutamina (Sigma) de acordo com as concentrações iniciais dos ensaios ou da necessidade de

alimentação das mesmas (ver item 5.1) e concentrações variadas de cloreto de sódio (S5886, Sigma, EUA) para manter a osmolalidade em 320mOsm/kg;

c) Meio 7 (Gibco): Gibco CD CHO AGT^{TM} (Invitrogen, EUA), acrescido de 1,168 g/L de glutamina (Sigma), 0,1% (v/v) de pluronic F68 (P1300, Sigma, EUA) e 1µL/L de β -Mercaptoetanol (Sigma). Este meio foi utilizado na adaptação da linhagem rHeLa.

d) Meio 8 (Si-CD): SAFC Ex-CellTM CD CHO (24360C, SAFC Bioscience, EUA) acrescido de 1,0 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Este meio foi utilizado na adaptação da linhagem rHeLa.

4.2.2.3 Meios isentos de soro

a) Meio 9 (HySF): HyClone SFM4CHOTM Utility Multi (SH30517.01, Hyclone, EUA) acrescido de 0,584 g/L de glutamina (Sigma) e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Este meio foi utilizado na adaptação da linhagem rHeLa e em ensaio em frasco *Spinner*. Apesar de ser uma formulação fechada, a concentração inicial de glicose de 4 g/L foi determinada no laboratório;

b) Meio 10 (Si-302): SAFC Ex-CellTM 302 CHO Serum-Free Medium (24326C, SAFC Bioscience, EUA) acrescido de 0,584 g/L de glutamina (Sigma) e 2,6 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Este meio foi utilizado na adaptação da linhagem rHeLa.

4.3 Sistemas de Cultivo

Foram utilizados cinco sistemas de cultivo, descritos abaixo:

a) Frascos T (Corning, EUA), com 25, 75 ou 150 cm² de área. A incubação foi feita a 37 °C, em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, em estufa (3110, Thermo Forma, EUA). Este sistema foi utilizado para a manutenção das linhagens em cultura, preparo de inóculo, adaptação das linhagens em meios sem soro e, finalmente, realização de estudos cinéticos preliminares;

b) **Frascos** *Spinner* de 150, 250 e 500 mL de volume útil (μCarrier, Bellco Biotech. Inc., modelo 1965, EUA), munidos de 1 impelidor com 2 pás planas (5 x 2,5 cm), posicionadas a

cerca de 5 mm do fundo. A agitação era controlada em 50 rpm por agitador magnético (modelo Bell multi-stir, Bellco Glass Inc., EUA). A incubação foi feita a 37 °C, em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, em estufa. Este sistema foi utilizado para a manutenção das linhagens em cultura, adaptação das linhagens a condições de cultivo em suspensão ou a meios isentos de soro (onde eram utilizados *Spinner* de 150 mL, com volume útil de 30 mL), preparo de inóculo (onde eram utilizados *Spinners* de 250 mL e de 500 mL, com volumes de trabalhos de 100 mL e 200 mL, respectivamente) e, finalmente, realização de estudos cinéticos;

c) **Placas de Petri** de 35x10mm (Corning, EUA) com 6 mL de volume de meio, utilizadas em ensaios de medida de eficiência de plaqueamento;

d) **Biorreatores:** foram utilizados 2 tipos de biorreator, sendo eles, um biorreator Modelo Biostat MD com controle DCU (B. Braun Diessel Biotech, Alemanha) e um biorreator Modelo Biostat B (B. Braun Diessel Biotech, Alemanha). Ambos com o mesmo tipo de dorna (volume total de 3 L) e conectados a um computador, que executa o *Software LabVIEW* (versão 7.1, National Instruments, EUA), sob o qual foi construído um programa desenvolvido pelo grupo do IPT, que monitorou todos os ensaios em biorreator. O programa funciona a partir do recebimento e envio de sinais analógicos externos, utilizando um "*FieldPoint*" (Modelo cFP-2200, National, Instruments, EUA).

Nos ensaios, o volume útil utilizado nos biorreatores, variou entre 1,5 L e 2 L.

Nos experimentos com a linhagem rHeLa utilizou-se ou um impelidor tipo 3-blade segment ou dois impelidores tipo 2-pitched blade, ambos com pás inclinadas a 45 °. Nos ensaios com a linhagem rSKHep, foi utilizado apenas um impelidor tipo 3-blade segment.

A transferência de oxigênio foi feita por difusão através de membrana de silicone (D_{EXT}=3mm; Espessura = 0,35 mm; L=5 m; marca SI-Schlauch, Alemanha).

Os sistemas dispunham de controle automático de:

- temperatura (37 °C);
- agitação (150 rpm para impelidor 3-blade segment e 90 rpm para impelidor 2pitched blade);
- oxigênio dissolvido pO₂ (5 a 50% da saturação de ar), mediante uso de eletrodo polarográfico (modelo A12/220, Metler-Toledo, EUA) e de misturador de gases (modelo Gas Mix Unit, B. Braun Biotech, Alemanha). O ar insuflado era uma mistura de ar (modelo EL-20157G, compressor)

BarionKar, modelo EL-20157G, Brasil), nitrogênio ultrapuro (White Martins, Brasil) e oxigênio ultrapuro (White Martins, Brasil);

 pH (7,4) mediante uso de eletrodo (modelo 405-DPAS-SC-K8S/225, Metler-Toledo, EUA). Para manter o *set-point* do pH em 7,4, foi utilizada adição de bicarbonato de sódio 0,5 N (Sigma) e ácido clorídrico 0,1 N (H9892,Sigma, EUA).

Estes sistemas foram utilizados para estudar o efeito das variáveis de interesse sobre o crescimento e o metabolismo das linhagens e para produção da proteína recombinante. Em ensaios operados em modo perfusão, foram utilizados outros equipamentos, os quais serão descritos, no item Descrição de ensaios.

Nos ensaios de medida do tempo de mistura em biorreatores, além dos impelidores citados acima, utilizou-se, também, impelidor do tipo *Rushton*;

e) Microcarregador Cytodex 1^{TM} (GE HealthCare, Suécia), com concentrações variando entre 3 a 15 g/L em ensaios de estudos cinéticos em frascos *Spinner* e de 3 a 9 g/L em ensaios em biorreator.

4.4 Preparo de Inóculo

Os inóculos dos ensaios com a linhagem rHeLa, em Spinner ou em biorreator foram preparados em Spinners.

O preparo do inóculo dependia do tipo de meio utilizado:

- a) Meio 1a (DMEM10%_a): os *Spinners* foram inoculados com 1,0x10⁵ cel/mL e incubados em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, em estufa durante 48 horas, a 37 °C, sob agitação de 50 rpm;
- b) Meios 5, 6a e 7 (HySF, HyCD_a e Si-ACF): os frascos Spinners foram inoculados com 2,0x10⁵ cel/mL e incubados em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, em estufa durante 72 horas, a 37 °C, sob agitação de 50 rpm.

Os inóculos dos ensaios com a linhagem rSKHep, em *Spinner* ou em biorreator, foram preparados em frascos T (Meios 1a ou 1b). Foram inoculados com $1,0x10^5$ cel/mL e incubados em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, em estufa durante 48 horas, a 37 °C.

Os inóculos dos ensaios em frascos T, com as linhagens rHeLa e rSKHep (Meio 1a) foram preparados neste mesmo tipo de frasco. Foram inoculados com $1,0x10^5$ cel/mL e incubados em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, em estufa durante 48 horas, a 37 °C.

Este tempo de coleta foi fixado para garantir que as células estariam sempre em fase de crescimento exponencial.

4.5 Preparo de Microcarregadores

A preparação dos microcarregadores (mic) compreende sete etapas (GE Heathcare, 2005):

- siliconização da superfície interna de todos os frascos de vidro utilizados. Para esta etapa foi utilizado um volume de 20 a 40 mL do reagente Sigmacote® (SL2, Sigma, EUA), o qual era adicionado, lentamente, aos frascos, visando formar uma película na parede interna. Após a secagem do silicone com o auxílio de uma capela de exaustão de gases, os frascos eram colocados em estufa por 24 horas;
- 2. pesagem exata da quantia de microcarregadores;
- hidratação dos microcarregadores em solução tampão fosfato-salino PBS (0,01 M e pH 7,4), cuja composição é: 7,6 g/L de NaCl (Sigma), 0,149 g /L de KCl (P5405, Sigma, EUA), 1,136 g/L de Na₂HPO₄ (S5136, Sigma, EUA) e 0,157 g/L de KH₂PO₄ (P5655, Sigma, EUA), com um volume de 50 a 100 mL PBS/g_{mic}, por 12 a 18 horas, à temperatura ambiente;
- duas lavagens com PBS com um volume de 30-50 mL/g_{mic}. Após os microcarregadores sedimentarem, retirava-se o sobrenadante (pipetando suavemente para não suspender os microcarregadores) e adicionava-se a solução de lavagem. Ao final do processo, o volume inicial era recomposto com PBS;
- esterilização dos microcarregadores em PBS, em autoclave a 120 °C, 1 atm de sobrepressão e 30 min;
- duas lavagens com o Meio 1a ou 1b, de acordo com o ensaio (20-50mL/g_{mic}), para reduzir a diluição do meio de cultura devido à solução salina remanescente;
- incubação do sistema em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, a 37 °C por 12 a 18 horas, antes do início do ensaio.

4.6 Descrição dos Ensaios

Neste item serão apresentadas as descrições dos ensaios, os quais estão divididos em três partes: i) ensaios com a linhagem rHeLa; ii) ensaios preliminares para determinação de variáveis de operação; iii) ensaios com a linhagem rSKHep.

4.6.1 Ensaios com a linhagem rHeLa

4.6.1.1 Estudos com meio de cultivo contendo SFB

4.6.1.1.1 Estudos preliminares em frascos T e Spinner

Inicialmente, procurou-se caracterizar o crescimento e o metabolismo da linhagem em estudo, nas condições originais de cultura, *i.e.*, no Meio 1a, empregando frascos tipo T como sistema de cultura (Ensaios 1 e 2, Tabela 4.1). A tabela 4.1 descreve as condições empregadas nestes estudos cinéticos.

Ainda nas mesmas condições de cultivo, foi estudado o efeito do pH inicial (Ensaios 3 a 6, Tabela 4.1). Os diferentes pH iniciais foram obtidos mediante adição de 1,25; 2,5; 3,7 e 6,5 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), respectivamente.

A influência da osmolalidade inicial do meio de cultura também foi estudada (Ensaios 4, 7 e 8, Tabela 4.1). As diferentes condições de osmolalidade inicial dos Ensaios 7 e 8 foram obtidas mediante adição de 1,40 e 3,32 g/L de NaCl (Sigma), respectivamente.

Nestes ensaios, a concentração inicial de células foi de $1,0x10^5$ cel/mL.

 Tabela 4.1 - Quadro de ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento e do metabolismo básico da linhagem rHeLa no Meio 1a.

Ensaio Nº	Nome no Laboratório	Objetivo	Linhagem	Sistema	V (mL)	Osm ₀ (mOsm/kg)	pH ₀
1	TF8_1	Cinéticas de referência	rHeLa original	T-25	6	360	7.4
2	TF8_2		8				.,
3	TF8_3		rHeLa original	T-25	6	330	7,0
4	TF8_4	Avalian a influência do nH inicial				347	7,3
5	TF8_5	Availar a influencia do pri iniciar				360	7,5
6	TF8_6					400	7,7
7	TF8_7	Avalian a influência da comolalidada inicial		т 25	6	390	7.2
8	TF8_8	Availar a initiaticia da osmolalidade inicial	rneLa originar	1-25	0	450	1,2
9	SpF8_1	Cinátions do referência	rHeLa adaptada ao crescimento	Comingon	100	360	74
10	SpF8_2	Cineucas de referencia	em suspensão (rHeLaDMEMSp)	sputter	100	500	7,4

(*) Osm₀: osmolalidade inicial e pH₀: pH inicial.

4.6.1.1.2 Adaptação da linhagem ao crescimento em suspensão

Inicialmente, a linhagem foi adaptada para crescimento em suspensão em meio contendo SFB (Meios 1a e 2), em sistema tipo *Spinner*, de acordo com o seguinte procedimento:

- a) a suspensão era transferida para tubos cônicos e aguardava-se a decantação parcial dos grumos;
- b) coletava-se o sobrenadante e procedia-se à individualização dos grumos utilizando-se uma solução de tripsina, cuja composição é: 2 g/L de tripsina (T4799, Sigma, EUA); 8 g/L de NaCl (Sigma); 0,3 g/L de KCl (Sigma); 1,14 g/L de Na₂HPO₄ (Sigma); 0,2 g/L de KH₂PO₄ (Sigma) e 0,2 g/L EDTA-Na (E6511, Sigma, EUA), para determinação da concentração celular;
- c) transferia-se as células para novo frasco Spinner contendo meio fresco (concentração inicial de 2,0x10⁵ cel/mL);
- d) incubava-se a cultura em estufa em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, a 37 °C, sob agitação de 50 rpm, por 48-96 horas, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo.

Após a adaptação da linhagem ao cultivo em suspensão, caracterizada por 5 subcultivos com o mesmo desempenho (concentração celular final semelhante), realizaram-se dois ensaios para avaliar a cinética de crescimento no Meio 1a. Nestes ensaios (Ensaios 9 e 10, Tabela 4.1), a concentração inicial de células foi de $1,0x10^5$ cel/mL.

4.6.1.2 Estudos com meio de cultivo isento de SFB

Os diferentes meios de cultura isentos de SFB (ver item 4.2) foram estudados para verificar a possibilidade de substituição do meio DMEM com 10% SFB. As atividades envolveram:

4.6.1.2.1 Adaptação da linhagem celular a meios isentos de SFB

Após a adaptação da linhagem ao crescimento em suspensão nos Meios 1a e 2, iniciouse a etapa de adaptação da linhagem a meios isentos de SFB. Foram avaliados os meios denominados 3 a 10 (vide item 4.2).

As tentativas de adaptação aos Meios 3, 4, 6a e 7 foram realizadas a partir das células adaptadas ao cultivo em suspensão, em meios contendo SFB (Meio 1a ou Meio 2). O protocolo utilizado foi o de troca gradual do meio contendo SFB pelo meio de adaptação.

As adaptações foram realizadas em *Spinner* com 30 mL de volume útil. Nos repiques eram utilizados: meio metabolizado (fixado em 3 mL, isto é 10% v/v de meio no cultivo subsequente), meio contendo SFB (até alcançar 0% de adição) e meio isento de SFB. A tabela 4.2 exemplifica como foi feito este processo de troca de meio.

Porcentagem de meio contendo SFB		Volume de meio com soro	Volume de Meio sem soro	Volume de meio metabolizado (mL)	
	(%) nominal	(%) real	(mL)	(mL)	
	75,00	77,50	20,25	6,75	
	50,00	52,75	13,50	13,50	
	25,00	27,78	6,75	20,25	
	12,50	14,04	3,38	23,63	
	6,25	7,04	1,69	25,31	3
	3,13	3,50	0,84	26,16	
	1,56	1,75	0,42	26,58	
	0,78	0,88	0,21	26,79	
	0,00	0,00	0,00	27,00	

Tabela 4.2 - Volumes de meio com SFB e isento de SFB no processo de adaptação celular.

A diferença observada entre a (%) de adição de meio com SFB e a (%) real de adição de meio com SFB é devido ao fato do meio metabolizado possuir resquícios de SFB.

No caso dos Meios 5, 8 e 10, o processo de adaptação iniciou-se a partir de células adaptadas ao Meio 4, isento de SFB e seguiu o mesmo protocolo de troca gradual de um meio pelo outro.

As etapas do processo de adaptação ao cultivo em meio isento de SFB estão descritas abaixo:

 a) homogeneizava-se o meio de cultura, no frasco Spinner, com as células a serem repicadas e retirava-se 1 mL de amostra;

- b) observavam-se as células no microscópico (modelo Axyovert, Zeiss, Alemanha) para avaliar a formação de grumos;
- c) se a quantidade de grumos fosse pequena, procedia-se a partir do item (m), caso contrário, homogeneizava-se novamente o meio contido no frasco *Spinner* e realizava-se a transferência de todo o meio para um tubo de fundo cônico compatível com o volume de meio;
- d) centrifugava-se a suspensão (280 g, 10 min, temperatura ambiente);
- e) descartava-se o meio metabolizado, porém reservava-se um volume deste meio (3 mL, Tabela 4.2), que correspondia a 10% (v/v) de meio no cultivo subsequente;
- f) adicionava-se 13 mL de PBS (0,01 M e pH 7,4) e homogeneizava-se lentamente com a pipeta. Esta era uma etapa de lavagem das células, para retirar resquícios de soro;
- g) centrifugava-se a suspensão (280 g, 10 min, temperatura ambiente);
- h) retirava-se o sobrenadante e procedia-se à individualização dos grumos utilizando 2 mL de uma solução de tripsina (Sigma) por 2 a 5 minutos. Agitava-se a suspensão suavemente algumas vezes durante este intervalo;
- i) inativava-se a solução de tripsina (Sigma) com 4 mL de Meio 1a ou 2;
- j) homogeneizava-se a suspensão e retirava-se 1 mL de amostra para determinação da concentração e viabilidade celular;
- calculava-se o volume de inóculo, para uma concentração inicial de células de 2,0 x 10⁵ cel/mL;
- m) centrifugava-se o volume correspondente de suspensão (280 g, 10 min, temperatura ambiente) para se iniciar um novo cultivo;
- n) retirava-se o sobrenadante;
- o) transferia-se para um *Spinner* o volume de meio metabolizado (reservado anteriormente), o volume de meio com soro compatível com a redução progressiva de SFB e completava-se o volume final com o meio isento de soro utilizado na adaptação;
- p) inoculava-se a suspensão no meio contido no Spinner;
- q) incubava-se a cultura em estufa em atmosfera a 5% (v/v) de CO₂, a 37 °C, sob agitação de 50 rpm, por 48-96 horas, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo.

4.6.1.2.2 Avaliação de cinéticas de crescimento em diferentes meios

Foram realizados 3 experimentos com diferentes meios e subpopulações de células selecionadas no processo de adaptação a esses meios (Meios 9, 4 e 6a), em *Spinner* (Ensaios 11 a 13, Tabela 4.3). Nestes ensaios, a concentração inicial de células foi de 2,0x10⁵cel/mL.

A tabela 4.3 descreve as condições empregadas nos estudos cinéticos preliminares, com as células adaptadas ao crescimento em suspensão e em meio de cultivo isento de SFB. Em todos os ensaios o pH inicial foi 7,4.

 Tabela 4.3 - Ensaios realizados para estudos cinéticos preliminares do crescimento e do metabolismo básico e da linhagem rHeLa em Spinner, em meios isento de soro.

				-		Meio de cultura				
Ensaio Nº	Nome no Laboratório	Objetivo	Linhagem	X ₀ (cel/mL)	V (mL)	Тіро	Aditivos	Osm ₀ (mOsm/kg)		
11	SpF8_3	Cinética em meio livre soro	rHeLaHySFSp	2,00E+05	120	9	Não	317		
12	SpF8_5	Cinética em meio livre soro	rHeLaSiACFSp	2,00E+05	120	4	Não	313		
13	SpF8_6	Cinética em meio livre soro	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	120	ба	Não	336		
14	SpF8_4	Avaliar a influência da concentração inicial de células	rHeLaHyCDSp	1,30E+05	120	ба	Não	336		
15 16 17 18 19 20 21	SpF8_7 SpF8_8 SpF8_9 SpF8_10 SpF8_12 SpF8_13 SpF8_14	Avaliar a influência da osmolalidade inicial	rHeLaSiACFSp	2,00E+05	140	4	Não	319 377 392 427 333 355 364		
22	SpF8 11	Avaliar a influência do volume de meio inicial	rHeLaSiACFSp	2,00E+05	250	4	Não	319		
23 24 25	SpF8_15 SpF8_16 SpF8_17	Avaliar a influência da adição de Pluronic F68	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	140	6a	Pluronic=0% (p/v) Pluronic=0,1% (p/v) Pluronic=0,2% (p/v)	317		
26 27	SpF8_18 SpF8_19	Avaliar a influência do volume de meio inicial	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	120 250	ба	Não	317		
28 29 30 31	SpF8_20 SpF8_21 SpF8_22 SpF8_23	Avaliar a influência da osmolalidade inicial	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	140	ба	Não	317 360 400 440		
32 33 34 35 36	SpF8_24 SpF8_25 SpF8_26 SpF8_27 SpF8_28	Avaliar a influência da adição do aminoácido Glutamina	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	140	ба	Não Glutamina=175 mg/L, no início do ensaio Glutamina= 350 mg/L, no início do ensaio Glutamina=175 mg/L, no fim da exponencial Glutamina=350 mg/L, no fim da exponencial	317		
37 38 39 40 41	SpF8_29 SpF8_30 SpF8_31 SpF8_32 SpF8_33	Avaliar a influência da adição dos aminoácidos Glutamina, Serina e Cistina	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	140	ба	Não Glutamina=350 mg/L, no tempo=55,2 h Serina=125 mg/L, no tempo=55,2 h Cistina=32,5 mg/L no tempo=55,2 h Glutamina=350 mg/L, Serina=125 mg/L e Cistina=32,5 mg/L, no tempo=55,2 h	317		
42 43 44	SpF8_34 SpF8_35 SpF8_36	Avaliar a influência da adição de aminoácido Cistina	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	140	6a	Não Cistina=32,5 mg/L, no início do ensaio Cistina=32,5 mg/L, no tempo=48 h	317		
45 46 47	SpF8_41 SpF8_42 SpF8_43	Influência da adição de suplementos Albumina e Aprotinina	rHeLaHyCDSp	2,00E+05	140	ба	Não 1 g/L de Albumina, no início do ensaio 1 g/L Aprotinina, no início do ensaio	317		
48	SpF8_44						1 g/L Albumina + 1 g/L Aprotinina, no início do ensaio			

4.6.1.2.3 Avaliação da influência de parâmetros sobre a cinética de crescimento

Neste momento, ainda não havia sido identificado o problema com a quantificação do rFVIII. Para esta etapa, foram selecionados dois meios (Meios 4 e 6a) e portanto, foram realizados estudos cinéticos com as linhagens adaptadas (rHelaSiACF e rHeLaHyCD, respectivamente) ao crescimento em suspensão nestes meios.

O objetivo almejado nestes ensaios era a otimização desses meios, visando à obtenção de alta densidade celular, em *Spinner*.

Com exceção do Ensaio 14, que começou com uma concentração celular de $1,3x10^5$ cel/mL, os outros ensaios começaram com uma concentração de $2,0x10^5$ cel/mL. O pH inicial era de 7,4. Maiores detalhes destes ensaios serão apresentados nos itens abaixo:

A) Estudos com o Meio 4

Neste meio de cultura foram avaliadas as influências de:

a) osmolalidade inicial, que variou entre 319 e 427 mOsm/kg (Ensaios 15 a 21, Tabela 4.3). As diferentes condições de osmolalidade inicial dos ensaios foram obtidas mediante adição de 0; 2,1; 2,4; 4,6; 0,3; 1,5; 1,8 e 0 g/L de NaCl (Sigma), respectivamente;

b) volume inicial de meio, que variou entre 120 e 250 mL (Ensaios 12, 15 e 22, Tabela 4.3).

B) Estudos com o Meio 6a:

Neste meio de cultura foram avaliadas as influências de:

- a) concentração celular inicial (Ensaios 13 e 14, Tabela 4.3). Nestes ensaios, a concentração inicial de células foi de $2,0x10^5$ e $1,3x10^5$ cel/mL, respectivamente;
- b) osmolalidade inicial, que variou entre 317 e 440 mOsm/kg (Ensaios 28 a 31, Tabela 4.3). As diferentes condições de osmolalidade inicial dos ensaios foram obtidas mediante adição 0; 1,5; 3,0 e 4,5 g/L de NaCl respectivamente;
- c) volume inicial de meio, que variou entre 120 e 250 mL (Ensaios 26 e 27, Tabela 4.2);

- d) adição de pluronic F68 (P1300, Sigma, EUA) ao meio (Ensaios 23 a 25, Tabela 4.3).
 As adições variaram entre 0 e 0,2% (p/v);
- e)adição dos aminoácidos glutamina (Sigma), serina (S5511, Sigma, EUA) e cistina (C6727, Sigma, EUA) ao meio. Os experimentos foram divididos em 3 testes:

i) avaliação do efeito da adição de glutamina (Ensaios 32 a 36, Tabela 4.3). Este conjunto de ensaios apresentou uma condição de referência (Ensaio 32), onde a concentração inicial de glutamina não foi alterada. Nos Ensaios 33 e 34 foram adicionados respectivamente, no instante inicial, 25 e 50% a mais de glutamina, em relação à concentração inicial do aminoácido no meio. E, no fim da fase exponencial de crescimento, foram adicionados 25 e 50% a mais de glutamina (Ensaios 35 e 36, respectivamente), em relação à concentração de glutamina neste instante do ensaio;

ii) avaliação dos efeitos da adição de glutamina, serina e cistina (Ensaios 37 a 41, Tabela 4.3). Este conjunto de ensaios apresentou uma condição de referência (Ensaio 37), onde as concentrações iniciais dos aminoácidos em estudo não foram alteradas. Nos demais ensaios, no tempo de 55,2 horas, foram adicionados 50% a mais de glutamina (Ensaio 38), 50% a mais de serina (Ensaio 39), 50% a mais de cistina (Ensaio 40) e 50% a mais de glutamina, serina e cistina (Ensaio 41), em relação à concentração inicial de aminoácidos no meio;

iii) avaliação dos efeitos da adição de cistina (Ensaios 42 a 44, Tabela 4.3). Este conjunto de ensaios apresentou uma condição de referência (Ensaio 42), onde a concentração inicial de cistina não foi alterada. Nos demais ensaios, foram adicionados 50% a mais de cistina nos tempos inicial e 48 horas, após o início do ensaio (Ensaios 43 e 44, respectivamente);

f) adição dos suplementos albumina e aprotinina (Sheffield, Inglaterra) ao meio (Ensaios 45 a 48, Tabela 4.3). O teste apresenta uma condição de referência (Ensaio 45), onde não houve adição de nenhum suplemento. Nas condições seguintes, foram adicionadas, no início do ensaio, concentrações equivalentes a 1 g/L de albumina, 1g/L de aprotinina e 1 g/L de albumina mais 1g/L de aprotinina (Ensaios 46 a 48, respectivamente).

A tabela 4.4 mostra o quadro completo de ensaios realizados com a linhagem rHeLaHyCD em biorreator. Todos os ensaios foram iniciados com $2,0x10^5$ cel/mL e o pH foi controlado em 7,4. Com exceção do Ensaio 49, que foi realizado com um volume útil de 1,5 L, os demais ensaios foram realizados com um volume útil de 2 L.

Paralelamente a cada um destes ensaios (Tabela 4.4), foi realizado um ensaio controle em *Spinner*, com o mesmo inóculo utilizado no biorreator para verificar a condição fisiológica do mesmo.

 Tabela 4.4 - Quadro completo de ensaios em biorreator com a linhagem rHeLaHyCD.

	•		Meio de cultura					Controle	
Ensaio Nº	Nome no Laboratório	Objetivo	Tipo	GLC ₀ (g/L)	GLN ₀ (mg/L)	Adição NaCl (g/L)	Osm ₀ (mOsm/kg)	pO ₂ (%)	Referência
49	BiF8_03	Cinética em biorreator	6a	8,0	700	-	270	30	
50	BiF8_08					-		30	
51	BiF8_10	Avaliar a influêcia do pO2	6a	8,0	700	-	270	5	
52	BiF8_11					-		50	
53	BiF8_12	Avaliar a influência da osmolalidade	6a	8,0	700	1,5	320	30	BiF8_08
54	BiF8_13	Avaliar a influência da concentração inicial	6b		350	2,1			
55	BiF8_14	do CLN	6a	8,0	1050	1,3	320	30	BiF8_12
56	BiF8_19	de OLN	6b		175	5,0			
57	BiF8_15	Avaliar a influência da concentração inicial	ба	17,0		0,5			
58	BiF8_17	Avaliar a linuencia da concentração línciar	6b	4,0	700	7,9	320	30	BiF8_12
59	BiF8_18		6b	2,0		15,0			
60	BiF8 25	Ensaio em perfusão com o spinfilter externo	6b	8.0	700	13	320	30	

(*) A adição de NaCl (Sigma) teve como objetivo ajustar a osmolalidade do meio.

4.6.1.3.1 Ensaios operados em modo batelada

O objetivo dos Ensaios 49 e 50 (Tabela 4.4) foi avaliar o efeito do uso e da quantidade de impelidores sobre a cinética de crescimento da linhagem. No Ensaio 49 foram utilizados dois impelidores tipo 2-*pitched blade* e no Ensaio 50 foi utilizado um impelidor 3-*blade segment*-45 °.

Os estudos cinéticos (Ensaios 50 a 59, Tabela 4.4) foram realizados sob diferentes condições de aporte dos substratos: glicose (GLC), glutamina (GLN) e pO_2 , e, consequentemente, diferentes níveis de influência dos inibidores: lactato (LAC) e amônio (NH_4^+) , com a finalidade de avaliar o efeito das concentrações iniciais destes substratos sobre o crescimento e o metabolismo da linhagem celular.

4.6.1.3.2 Ensaio operado em modo perfusão

Após a definição de algumas variáveis obtidas em ensaios operados em batelada, foi realizado um ensaio operado em perfusão (Ensaio 60, Tabela 4.4), com o Meio 6b.

Os objetivos do ensaio eram manter baixas concentrações de substratos e subprodutos dentro do biorreator e um tempo de residência de 24 horas, isto é, uma vazão específica de alimentação (D) de 0.04 h^{-1} .

As concentrações almejadas de glicose (Sigma) e glutamina (Sigma) dentro do biorreator eram de 1 g/L e 350 mg/L, respectivamente. Para isso, utilizou-se uma estratégia de alimentação de substratos, os quais estavam divididos em 3 frascos de alimentação. A composição das vazões dos meios contidos nos 3 frascos permitia suprir as necessidades das células durante o ensaio e, também, permitia um atuação mais acertiva, se houvesse excesso de algum destes substratos ou dos dois substratos durante o ensaio, com a diluição destes no meio do biorreator.

O grau de dificuldade deste ensaio exigiu uma montagem complexa do sistema (Figura 4.1).

Ao biorreator foram acoplados (Figura 4.1):

- 3 frascos de alimentação: 1 frasco contendo o Meio 6b acrescido de 15 g/L de glicose (Sigma), 1 frasco contendo o Meio 6b acrescido de 10 g/L de glutamina (Sigma) e 1 frasco contendo apenas o Meio 6b. As alimentações era feitas com o auxílio de 3 bombas peristálticas: *drive* (modelo 7523-37 Masterflex, EUA) e cabeçote (75018-60, Easy-Load I, EUA), *drive* (modelo 7521-57, Masterflex, EUA) e cabeçote (7519-20, Masterflex, EUA), drive (modelo 7520-40, Masterflex, EUA) e cabeçote (7519-20, Masterflex, EUA). Em cada bomba havia 2 linhas com mangueiras de tipos diferentes: 6485-13 (Masterflex, EUA) e 6485-14 (Masterflex, EUA), que permitiam ser trocadas para atender às necessidades das vazões de operação;
- 1 spinfilter externo (ESF 100G, Sartorius, Alemanha), com filtro de malha 20 μm (8843864, Sartorius, Alemanha) para retenção celular. O meio de cultura com as células era bombeado do biorreator para este sistema com auxílio de uma bomba peristáltica tipo: *drive* (modelo 7520-40, Masterflex, EUA), cabeçote (77200-50, Easy-Load II, EUA) e mangueira (6485-14, Masterflex, EUA). No filtro permeava o meio com substratos e subprodutos, que eram bombeados para fora do sistema, com o auxílio da bomba peritáltica: *drive* (modelo 7521-57, Masterflex, EUA), cabeçote

(75018-60, Easy-Load I, EUA) e mangueira (6485-14, Masterflex, EUA). As células retidas pelo filtro, retornavam ao biorreator, com a finalidade de atingir a alta densidade celular;

- 1 frasco de descarte de meio (Frasco 1, Figura 4.1), que recebia o meio bombeado para fora do *spinfilter* externo (Sartorius);
- 1 frasco de descarte (Frasco 2, Figura 4.1), que recebia o meio retirado com o auxílio da bomba peristáltica do biorreator Biostat B (B. Braun Diessel Biotech), a qual ficava ligada o tempo inteiro com uma vazão alta. Este meio era bombeado por intermédio de um tubo posicionado de forma a manter constante o volume no biorreator, isto é, este dispositivo servia para que o excesso de meio e espuma (formada ao longo do cultivo) fossem retirados do sistema.



Figura 4.1 - Esquema do ensaio operado em perfusão com *spinfilter* externo, utilizando 3 frascos para alimentação ($D_{M,0}$, $D_{GLC,0}$ e $D_{GLN,0}$), 1 frasco para saída de meio condicionado no interior do *spinfilter* externo (Frasco 1) e 1 frasco para retirada de meio condicionado em excesso no biorreator, para controle de volume (Frasco 2). D: vazão específica de alimentação do ensaio (h^{-1}); $D_{M,0}$: vazão específica de alimentação de meio (h^{-1}); $D_{GLC,0}$ – vazão específica de alimentação de glicose (h^{-1}); $D_{GLN,0}$ – vazão específica de alimentação de glicose (h^{-1}); $D_{GLN,0}$ – vazão específica de alimentação de glicose (h^{-1}).

O Ensaio 60 (Tabela 4.4) começou com uma batelada, cujas condições iniciais foram: 2 L de volume útil, o qual foi mantido durante a operação em perfusão e concentração inicial de células de $2,0x10^5$ cel/mL. No meio da fase exponencial de crescimento iniciou-se a operação em perfusão.

A soma das vazões específicas das 3 alimentações ($D_{M,0}$, $D_{GLN,0}$ e $D_{GLC,0}$) resultava na vazão específica necessária para se ter o tempo de residência de 24 horas. Os cálculos destas vazões eram realizados a partir das amostras retiradas do biorreator, onde eram analisadas as concentrações de glicose e amônio. Como a análise de aminoácidos é muito cara, aferia-se a concentração de glutamina, através da concentração de amônio.

4.6.2 Estudos preliminares para determinação de variáveis de operação

4.6.2.1 Estudos referentes à homogeneidade do sistema (Tempo de mistura)

Tempo de mistura (θ_M) característico do biorreator representa efetivamente o grau de homogeneidade do sistema, frente às diferentes condições de agitação e geometrias do biorreator (volume útil e tipo, número e posicionamento dos impelidores), bem como a influência da posição da adição do traçador na resposta obtida. A metodologia utilizada foi baseada no trabalho de Xing et al., (2009), onde foi definido que o tempo para atingir 95% da saturação, após a adição de um traçador a uma solução salina, corresponde ao tempo de mistura.

O θ_M foi avaliado utilizando-se um método de perturbação em degrau, com adição de 1 mL do traçador NaOH 1 N (S8045, Sigma, EUA) à uma solução de 8 g/L de NaCl (Sigma) a 37°C, com pH₀=5, e posterior aquisição dos valores de pH, em função do tempo, até que esses se estabilizassem. A figura 4.2 mostra um esquema do experimento.

As características geométricas do biorreator que foram avaliadas neste estudo são:

a) diferentes tipos de impelidores: *Rushton*, 2-*pitched-blade* e 3-*blade segment* (pás formando ângulos de 45 e 60 °) (ver Figura 3.8);

- b) número de impelidores: 1 ou 2;
- c) agitação: 70 a 500 rpm;
- d) volume útil do reator: 1,5 e 2,0 L;
- e) posição de adição do traçador: na superfície do líquido ou em profundidade.



Figura 4.2 - Esquema do experimento Tempo de Mistura.

4.6.2.2 Estudo da eficiência de retenção celular de um spinfilter externo

Para definir a condição que maximiza a eficiência de retenção celular no *spinfilter* externo (Sartorius), foi montado um sistema (Figura 4.3). Os ensaios foram realizados com filtros de porosidade 20 μ m (BB8843864, Sartorius, Alemanha) e 40 μ m (BB8808573, Sartorius, Alemanha). Partículas de *Superose 6 prep grade* (GE HealthCare, EUA), de diâmetro 30±10 μ m, foram utilizadas para simular as células. O volume útil foi de 700 mL de uma mistura de 80% água e 20% etanol, em *Spinner* e com uma concentração inicial média de *beads* de (3,0±0,5)x10⁶ *beads*/mL. O custo dos *beads* impossibilitou a realização dos ensaios em biorreator.

Inicialmente, realizou-se uma série de 20 ensaios com o filtro de porosidade 40 μ m, utilizando a técnica de planejamento experimental com o objetivo de identificar as melhores condições de operação. O planejamento foi do tipo DCCR (Delineamento composto central rotacional) (RODRIGUES; IEMMA, 2005), com 2³ pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 6 pontos centrais, com o auxílio do *Software Design Expert* (versão 8.0.6 trial, Stat-Ease, EUA).

A Tabela 4.5 mostra o planejamento experimental, onde 3 variáveis foram estudadas: i) a vazão específica de alimentação do sistema (2,5<D<8,53 d⁻¹); ii) a vazão de recirculação no *spinfilter* (50<Q_R<114mL/min) e; iii) a rotação do *spinfilter* no seu próprio eixo (65< ω <485 rpm). Em intervalos de tempo regulares retiravam-se amostras de dois pontos distintos (ver Figura 4.3). A partir destas amostras determinavam-se as concentrações de *beads* em ambas as correntes do *spinfilter*, as quais eram realizadas por contagem em câmara de Neubauer e o experimento era finalizado, quando se obtinham pelo menos quatro patamares constantes das concentrações de ambas as correntes.



Figura 4.3 - Esquema para o estudo de retenção com o *spinfilter* externo (Sartorius). D: Vazão específica de alimentação (d⁻¹); Q_R: Vazão de recirculação (mL/min); Q_D: Vazão de alimentação (mL/min); C_{RE}: Concentração de *beads* na corrente de retorno; C_R: Concentração de *beads* na corrente de circulação; e ω: rotação (rpm).

Para baixas rotações do *spinfilter*, calculava-se a eficiência de retenção da seguinte maneira: media-se a concentração de *beads* na corrente Q_R-Q_D (Amostra 1) e dividia-se pela concentração média de *beads* na entrada, obtida pela a média aritmética de todos os valores de concentração do *Spinner* (Amostra 2), durante o ensaio (Figura 4.3, Equação 4.1). Isso era feito, pois neste caso, a hipótese de homogeneidade do sistema era válida e, assim, a média era uma maneira de amenizar os erros de contagem. Para altas rotações, por outro lado, a hipótese de homogeneidade tornou-se inválida, portanto optou-se por calcular a concentração de *beads* na corrente Q_R-Q_D (Amostra 1) e dividir pela concentração inicial de *beads* na entrada do *spinfilter*, isto é, a concentração inicial de *beads* no *Spinner* (Figura 4.3, Equação 4.2).

$$E = \frac{(Q_R - Q_D) \cdot C_{R\varepsilon}}{Q_R \cdot \left(\frac{\sum_{i=1}^{n} C_R}{n}\right)}$$
(4.1)

$$E = \frac{(Q_R - Q_D).c_{Re}}{Q_R.c_{R,0}} \tag{4.2}$$

Onde:

E-Retenção (%);

C_{R,0}- Concentração inicial de *beads* dentro do *Spinner* (*beads*/mL);

C_R- Concentração de *beads* na corrente de circulação (*beads/mL*) ou dentro do *Spinner*;

C_{Re} – Concentração de *beads* na corrente de retorno (*beads*/mL);

Q_R - Vazão de recirculação (mL/min);

 $Q_D - Vazão$ de alimentação (mL/min);

n – número de amostras.

Tabela 4.5 - Planejamento experimental realizado com o auxílio do Software Design Expert.

Ensaios	D (d ⁻¹)	Q _R (mL/min)	ω (rpm)	Ordem sugerida para realização dos Ensaios no Planejamento
	- (-)			Experimental
1	2,50	61,00	150,00	9
2	7,00	61,00	150,00	14
3	2,50	100,00	150,00	17
4	7,00	100,00	150,00	20
5	2,50	61,00	400,00	4
6	7,00	61,00	400,00	13
7	2,50	100,00	400,00	15
8	7,00	100,00	400,00	11
9	0,97	80,50	275,00	6
10	8,53	80,50	275,00	19
11	4,75	47,71	275,00	10
12	4,75	113,29	275,00	2
13	4,75	80,50	64,78	12
14	4,75	80,50	485,22	3
15	4,75	80,50	275,00	7
16	4,75	80,50	275,00	1
17	4,75	80,50	275,00	18
18	4,75	80,50	275,00	8
19	4,75	80,50	275,00	5
20	4,75	80,50	275,00	16

4.6.3.1 Estudos preliminares em frascos T

Inicialmente, procurou-se caracterizar o crescimento e o metabolismo da linhagem em estudo, nas condições originais de cultura, *i.e.*, no Meio 1a, empregando frascos tipo T como sistema de cultura (Ensaios 61 e 62, Tabela 4.6). A tabela 4.6 descreve as condições empregadas nos estudos cinéticos. As osmolalidades e pH iniciais foram de 360 mOsm/kg e 7,4, respectivamente, em todos os ensaios.

 Tabela 4.6 - Ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento, do metabolismo básico e da produção de rFVIII da linhagem rSKHep.

Ensaio Nº	Nome no Laboratório	Objetivo	Sistema	V (mL)	X ₀ (cel/mL)	X _{MIC,0} (cel/mic)	C _{MIC,0} (gmic/L)
61	TF8_9	Cinóticos do roforôncio	т 25	6	1,00E+05		
62	TF8_10	Cineticas de referencia	1-25	0	2,00E+05	-	-
63	SpF8_46				1,29E+04	1	
64	SpF8_47	Avaliar a influência do número inicial de	Spinner	140	3,87E+04	3	3
65	SpF8_48	células/microcarregador			6,45E+04	5	
66	SpF8_49				1,03E+05	8	
67	SpF8_50				1,29,E+04		3
68	SpF8_51	Avaliar a concentração inicial de	Spinner	140	2,58E+04	1	6
69	SpF8_52	microcarregadores			3,87E+04		9
70	SpF8_53				6,45E+04		15
71	SpF8_54	Avaliar a influência do número inicial de células/microcarregador	Spinner	140	3,87E+04	3	3

4.6.3.2 Medida da eficiência de plaqueamento da célula rSKHep

A eficiência de plaqueamento das células rSKHep foi feita em duplicata, com o Meio 1a. Foram inoculadas cerca de 200 e 500 células (teoricamente), em fase exponencial de crescimento, em placa de Petri (Corning) de 6 cm de diâmetro, com um volume de 6 mL de meio.

Em seguida, as células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% (v/v) de CO_2 a 37 °C, durante 7 dias. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e as placas foram lavadas com PBS (0,01 M e pH 7,4). Adicionou-se 6 mL de uma solução de cristal violeta 0,1% (p/v) em água, por 10 minutos, com o objetivo de corar as colônias. A solução foi retirada e procedeu-se à contagem das colônias em microscópio óptico (Zeiss).

A eficiência de plaqueamento foi calculada pela Equação 4.3:

$$EP = \frac{N \acute{u}mero \ de \ colônias \ formadas}{N \acute{u}mero \ total \ de \ células \ inoculadas}$$
(4.3)

4.6.3.3 Estudos preliminares em frasco Spinner

4.6.3.3.1 Influência do número inicial de células por microcarregador

Os Ensaios 63 a 66 (Tabela 4.6) foram realizados visando determinar a melhor condição inicial de número de células por microcarregador ($X_{MIC,0}$), que maximizasse o crescimento, mas não deixasse microcarregadores vazios.

Desta forma, foi fixada a concentração inicial de microcarregadores ($C_{MIC,0}$) em 3 gmic/L e foram testados quatro valores iniciais diferentes de $X_{MIC,0}$: 1, 3, 5 e 8 cel/mic, no Meio 1a.

O Ensaio 71 foi uma repetição do Ensaio 47 (Tabela 4.6) para verificação de reprodutibilidade e das metodologias adotadas nestes ensaios.

4.6.3.3.2 Influência da concentração de microcarregadores

Os Ensaios 67 a 70 (Tabela 4.6) foram realizados visando determinar a melhor concentração inicial de microcarregadores, o que equivale a diferentes condições de disponibilidade de área superficial para crescimento.

Desta forma, fixou-se o $X_{MIC,0}$ em 1 cel/mic e foram testadas 4 condições de $C_{MIC,0}$, que variaram entre 3 a 15 gmic/L no Meio 1a.

4.6.3.4 Ensaios em biorreator

Todos os ensaios da tabela 4.7 foram realizados com 1,5 L de volume útil e tiveram o pH e o oxigênio dissolvido controlados em 7,4 e 30% de saturação do ar, respectivamente. A osmolalidade inicial dos ensaios foi de 360 mOsm/kg.

4.6.3.4.1 Ensaios operados em modo batelada

Os Ensaios 72 e 73 (Tabela 4.7) foram realizados visando a verificação, já obtida em ensaio em *Spinner*, da melhor concentração inicial de microcarregadores ($C_{MIC,0}$) em biorreator, operado em batelada, com o Meio 1a.

Após a realização destes dois ensaios, foi feito um terceiro experimento (Ensaio 74, Tabela 4.7), já com a melhor concentração inicial de microcarregadores, com o Meio 1b, também operado em batelada. O objetivo deste ensaio foi testar a expressão da proteína recombinante, em um meio com apenas 5% de SFB.

 Tabela 4.7 - Ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento, do metabolismo básico e da produção de rFVIII da linhagem rSKHep.

Ensaio Nº	Nome no Laboratório	Objetivo	Meio de cultura	X ₀ (cel/mL)	C _{MIC,0} (gmic/L)
72	BiF8_20	Cinéticas de referência com $X_{MIC,0}$ de 3 cel/mic e	1.0	1,20E+05	9
73	BiF8_21	C _{MIC,0} variadas	18		3
74	BiF8_22	Cinética de referência com $X_{MIC,0}$ de 3 cel/mic e 5% (v/v) de SFB	1b	3,87E+04	3
75	BiF8_24	Ensaio em perfusão para produção de lote de rFVIII	1c	3,87E+04	3

4.6.3.4.2 Ensaio operado em modo perfusão

Após a definição de algumas variáveis obtidas em ensaios operados em batelada, foi realizado um ensaio operado em perfusão (Ensaio 75, Tabela 4.7), com o Meio 1c.

O grau de dificuldade deste ensaio também exigiu uma montagem complexa do sistema. Ao biorreator foram acoplados (Figura 4.4):

3 frascos de alimentação: 1 frasco contendo o Meio 1c acrescido de 15 g/L de glicose (Sigma), 1 frasco contendo o Meio 1c acrescido de 10 g/L de glutamina (Sigma) e 1 frasco contendo apenas o Meio 1c. As alimentações era feitas com o auxílio de 3 bombas peristálticas: *drive* (modelo 7523-37 Masterflex, EUA) e cabeçote (75018-60, Easy-Load I, EUA), *drive* (modelo 7521-57, Masterflex, EUA) e cabeçote (7519-20, Masterflex, EUA), drive (modelo 7520-40, Masterflex, EUA) e cabeçote (7519-20, Masterflex, EUA). Em cada bomba havia 2 linhas com mangueiras de tipos diferentes: 6485-13 (Masterflex, EUA) e 6485-14 (Masterflex, EUA), que permitiam ser trocadas para atender às necessidades das vazões de operação;

- I spinfilter interno com malha 40 µm (BB8808573, Sartorius, Alemanha) para retenção celular. No filtro permeava o meio com substratos, subprodutos e a proteína recombinante de interesse, que eram bombeados para fora do sistema, com o auxílio da bomba peritáltica: *drive* (modelo 7521-57, Masterflex, EUA), cabeçote (75018-60, Easy-Load I, EUA) e mangueira (6485-16, Masterflex, EUA). Este meio era bombeado por intermédio de um tubo posicionado de forma a manter constante o volume no biorreator, isto é, este dispositivo também servia para que o excesso de meio e espuma (formada ao longo do cultivo) fossem retirados do sistema. As células aderidas aos microcarregadores ficavam retidas pelo filtro e permaneciam no biorreator, visando atingir a alta densidade celular;
- 1 frasco de descarte de meio, que recebia o meio bombeado de dentro do *spinfilter* interno (Sartorius). Este frasco ficava dentro de um isopor com gelo e foi trocado várias vezes durante o ensaio, para armazenamento da proteína recombinante no ultrafreezer a -80°C (MDF-U53VC, Sanyo, Japão).

O Ensaio 75 (Tabela 4.7) começou com uma batelada, cujas condições iniciais foram: 1,5 L de volume útil, o qual foi mantido durante a operação em perfusão, $C_{MIC,0}$ de 3 gmic/L, $X_{MIC,0}$ de 3 células/microcarregador. No meio da fase exponencial de crescimento iniciou-se a operação em perfusão.

Os objetivos do ensaio eram manter baixas concentrações de substratos e subprodutos dentro do biorreator e um tempo de residência de 24 horas, isto é, uma vazão específica de alimentação (D) de 0.04 h^{-1} .

As concentrações almejadas de glicose (Sigma) e glutamina (Sigma) dentro do biorreator eram de 1 g/L e 350 mg/L, respectivamente. Para isso, utilizou-se uma estratégia de alimentação de substratos, os quais estavam divididos em 3 frascos de alimentação.

A soma das vazões específicas das 3 alimentações ($D_{M,0}$, $D_{GLN,0}$ e $D_{GLC,0}$) resultava na vazão específica necessária para se ter o tempo de residência de 24 horas. Os cálculos destas vazões eram realizados a partir das amostras retiradas do biorreator, onde eram analisadas as concentrações de glicose e amônio.



Figura 4.4 - Esquema do ensaio operado em perfusão com *spinfilter* interno, utilizando 3 frascos para alimentação (D_{M,0}, D_{GLC,0} e D_{GLN,0}) e 1 frasco para saída de meio condicionado no interior do *spinfilter* interno. D: vazão específica de alimentação do ensaio (h⁻¹); D_{M,0}: vazão específica de alimentação de meio (h⁻¹); D_{GLC,0} – vazão específica de alimentação de glicose (h⁻¹); D_{GLN,0} – vazão específica de alimentação de glutamina (h⁻¹).

4.6.4 Tratamento das amostras

Para todos os ensaios indicados nas tabelas 4.1, 4.3, 4.4, 4.6 e 4.7, foram coletadas amostras em intervalos de tempo regulares. O procedimento de amostragem variava de acordo com o sistema utilizado. Nos ensaios em frascos T, *Spinner* e biorreator operado em batelada eram retiradas 2 amostras por dia. No biorreator operado em perfusão eram retiradas 5 amostras por dia.

Em todos os sistemas, após as amostras serem centrifugadas, eram retiradas 4 alíquotas de 100 µL, para posterior análise de rFVIII, as quais eram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C (MDF-U53VC, Sanyo). O restante era armazenado em freezer comum a -20 °C (Brastemp) até o momento das análises de determinação do consumo de glicose e aminoácidos e síntese de metabólitos (lactato e amônio).

O tratamento específico para cada um dos sistemas está descrito abaixo:
a) Ensaios em frascos T

Nestes ensaios, cada amostra era constituída de dois frascos iguais (duplicata), dos quais, inicialmente, media-se o pH e, na sequência, retirava-se o sobrenadante, transferia-se este para um tubo de fundo cônico para centrifugação (280 g, 10 min, temperatura ambiente). Procedia-se, então, à armazenagem do sobrenadante das amostras para as análises posteriores.

Ao frasco T, com as células aderidas, adicionava-se 4 mL de uma solução de PBS (0,1M e pH 7,4) para remoção de resquícios de SFB. Em seguida, este volume era retirado e adicionava-se 2 mL de uma solução de tripsina 0,5% (p/v) / EDTA 0,02% (p/v) (reagentes Sigma). Esperava-se aproximadamente 5 minutos até que todas as células estivessem soltas e adicionava-se 4 mL de Meio 1a para inativação da tripsina. Em seguida, procedia-se às medidas de concentração celular e viabilidade.

b) Ensaios com células em suspensão em Spinner e Biorreator

Nestes ensaios retirava-se um volume de 6 mL (*Spinner*) e 15 mL (Biorreator) do sistema. Primeiramente, media-se o valor do pH. Em seguida, separava-se uma parcela (aproximadamente 1 mL) para determinação da concentração celular e da viabilidade e o restante era centrifugado (280 g, por 10 min, temperatura ambiente). Na sequência, os sobrenadantes das amostras eram armazenados para as análises posteriores.

c) Ensaios com células aderentes em microcarregadores em Spinner e Biorreator

Nestes ensaios retirava-se um volume de 6 mL (*Spinner*) ou 15 mL (Biorreator) do sistema. Inicialmente, media-se o pH da amostra. Antes de proceder à determinação da concentração celular e da viabilidade, era necessário tripsinar os microcarregadores, isto é, descolar as células aderidas a eles. O procedimento utilizado está descrito abaixo:

- a) tomava-se 1 mL de amostra para ensaios em Spinner ou 2 mL para ensaios em biorreator;
- b) esperava-se a sedimentação dos microcarregadores (1,5 min);
- c) descartava-se 0,7 mL do sobrenadante (Spinner) ou 1,7 mL (biorreator);
- d) lavavam-se os microcarregadores com 0,7 mL (*Spinner*) ou 1,7 mL (biorreator) da solução de PBS (0,1M pH 7,4). Removia-se o volume de lavagem;

- e) adicionava-se 0,5 mL (*Spinner*) ou 1,1 mL (biorreator) de uma solução de tripsina, cuja composição é: 5 g/L de tripsina (Sigma); 8 g/L de NaCl (Sigma); 0,3 g/L de KCl (Sigma); 1,14 g/L de Na₂HPO₄ (Sigma); 0,2 g/L de KH₂PO₄ (Sigma) e 0,2 g/L EDTA-Na (E6511, Sigma, EUA);
- f) aguardava-se o descolamento das células, a 37 °C por 1 hora. Agitava-se suavemente o *pellet* de 10 em 10 minutos, para melhorar a ação da tripsina;
- g) neutralizava-se a tripsina com 0,2 mL (Spinner) ou 0,6 mL (biorreator) de Meio 1a;
- h) procedia-se à determinação da concentração celular e viabilidade celular.

O restante das amostras era centrifugado (280g, 10 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante era armazenado para as análises posteriores.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Concentração celular

Após os diferentes tipos de tratamento dado às células aderentes ou não aderentes (ver item 4.6.4), procedia-se à determinação da concentração de células, a qual era efetuada, através da média da contagem em duas câmaras de Neubauer (FRESHNEY, 2005), utilizando microscópio ótico (modelo Axyovert, Zeiss, Alemanha).

As contagens eram feitas de forma a se obter entre 30 e 50 células por campo. Quando necessário, a amostra era previamente diluída em PBS (0,1M e pH 7,4).

4.7.2 Viabilidade

A viabilidade foi avaliada utilizando-se o método de exclusão por corante azul de tripan (T6146, Sigma, EUA). Neste método, adiciona-se uma solução de azul de tripan (Sigma) 0,4% (p/v) em PBS à suspensão de células, na proporção 1:1 (amostra: azul de tripan). As células mortas não conseguem excluir este reagente do citoplasma e aparecem azuis (GORJÃO, 2005).

Medida da ocupação da superfície do frasco de cultivo pelas células, mediante observação da cultura utilizando microscópio ótico (Zeiss). O resultado era expresso em termos percentuais, em relação à área total.

4.7.4 Confluência celular em Microcarregadores

A medida da confluência celular foi realizada, segundo um método de observação da área ocupada pelas células sobre os microcarregadores, que é descrito a seguir:

- a) colocava-se um pequeno volume (entre 10 e 20 μL) de amostra com microcarregadores sobre os quadrantes da câmara de Neubauer sem a lamínula, de modo a se poder contar cerca de 100 microcarregadores e garantir uma medida estaticamente confiável. As grades da câmara eram usadas apenas como um guia para a contagem;
- b) adicionava-se cerca de 2 μL da solução de tripan blue 0,4% p/v (Sigma). Os microcarregadores que não tinham células aderidas ficavam azuis, porém onde havia células viáveis aderidas, o corante não era absorvido, facilitando assim a contagem;
- c) contavam-se os microcarregadores vazios, os confluentes, os que tinham menos de 10% de área ocupada, aqueles que tinham entre 10 e 50% e os que tinham entre 50 e 100% de área de confluência;
- d) os resultados eram expressos como percentual de microcarregadores em cada uma das categorias de confluência indicados anteriormente (%Mic₀,%Mic₁₀,%Mic₁₀₋₅₀,%Micc₅₀₋₁₀₀,%Mic₁₀₀).

4.7.5 Determinação da concentração de glicose

As amostras armazenadas a -20 °C, eram descongeladas à temperatura ambiente e desproteinizadas usando solução de ácido tricloroacético (TCA) na concentração de 240 g/L, numa proporção de 4:1 (volume de amostra: volume de TCA) e centrifugadas a 3220 g (5810R, Eppendorf), por 20 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante era então filtrado em membrana de porosidade 0,45 µm (Millipore, EUA) antes da injeção na coluna cromatográfica. Quando necessário, as amostras eram diluídas de forma que a concentração

de glicose da amostra ficasse dentro da faixa de concentração de glicose da curva de calibração.

Para determinação de glicose, utilizou-se o método de cromatografia líquida (HPLC), realizado em equipamento da marca Waters (Milford, EUA): bomba (modelo W510 ou W600E), detector de índice de refração (modelo W410 ou W2414), injetor automático (modelo W717), programa Millenium 3.20 para controle do sistema. O sistema de colunas cromatográficas era composto de uma pré-coluna Shodex SC-G e de coluna Shodex SC1011. A temperatura do forno da coluna empregada foi de 72 °C e a do detector foi de 45 °C. Como fase móvel da coluna foi utilizada uma solução de EDTA[Ca][Na]₂ na concentração de 0,187 g/L com vazão de 0,6 mL/min. O volume de injeção era de 10µL e o tempo de corrida de 45 minutos. A cada lote de amostras analisadas, foi feita uma curva de calibração a partir de diluição sucessiva de uma solução padrão de 3,0 g/L de glicose (G7021, Sigma, EUA) previamente preparada.

4.7.6 Determinação da concentração de lactato

As amostras foram desproteinizadas conforme descrito no item 4.7.5.

Para determinação da concentração de lactato utilizou-se também o método de cromatografia líquida (HPLC), realizado em equipamento da marca Waters (EUA): bomba modelo (W510 ou W600E), detector de índice de refração (modelo W410 ou W2414), injetor automático (modelo W717), programa Millenium 3.20 para controle do sistema. O sistema de colunas cromatográficas era composto de uma pré-coluna shodex SH-G e de coluna Shodex SH1011. A temperatura do forno da coluna empregada foi de 60 °C e a do detector, de 45 °C. Como fase móvel da coluna foi utilizada solução de H₂SO₄ 0,1N (Merck, Brasil) com vazão de 1,0 mL/min. O volume de injeção era de 20 μ L e o tempo de corrida, de 20 minutos. A cada lote de amostras analisadas, foi feita uma curva de calibração a partir de diluição sucessiva de uma solução padrão de lactato de 3,0 g/L (L6402, Sigma, EUA) previamente preparada.

4.7.7 Determinação da concentração de amônio

Para a determinação de amônio, foi utilizado um potenciômetro (Mettler, modelo 225, EUA) e um eletrodo específico (modelo 9512, Orion, EUA) que detecta variações de milivoltagem quando ocorre a conversão de amônio em amônia, pela adição de NaOH.

Para isto, adicionava-se uma solução de NaOH 10M (Merck, Brasil) às amostras na proporção 1:100 (álcali:amostra). As curvas de calibração eram feitas com soluções padrão de sulfato de amônio (Merck, Brasil) nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm. Amostras de referência produzidas no próprio laboratório eram utilizadas na validação das curvas de calibração.

4.7.8 Determinação da concentração de aminoácidos

A medida de concentração de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em um equipamento com bomba (modelo GP40, Dionex, EUA), detetor de absorbância (modelo AD20, Dionex, EUA), injetor automático (modelo SpectraSeries AS100, (ThermoSeparations Products, EUA) com *loop* de 50 µL, forno para colunas, reator (modelo PCX 3100, Pickering Lab., EUA) e o programa de integração Peaknet (v. 51, Dionex, EUA). O sistema de colunas era composto de uma pré-coluna de lítio de 2x20 mm (Pickering Lab., EUA) e de uma coluna *High Efficiency Lithium* 3x150 mm (Pickering Lab., EUA).

A metodologia utilizada foi a de derivação pós-coluna a 130 °C, com ninidrina (Treone T200, Pickering Lab., EUA). A eluição foi realizada pela variação de pH com os tampões Li280 pH 2,8 e Li 750 pH 7,5 (Pickering Lab., EUA). Tanto a vazão da fase móvel, quanto à de ninidrina foram de 0,3 mL/min. A pré-coluna e a coluna eram mantidas a 45 °C.

Antes de aplicadas ao cromatógrafo, as amostras eram diluídas com água Milli-Q. Em seguida, tomava-se 1 mL da solução diluída e adicionava-se 0,6 mL do reagente Seraprep (Pickering Lab., EUA) e 0,4 mL de solução de padrão interno (D,L-Homoscitina 0,25 g/L, Pickering Lab., EUA).

A solução era homogeneizada e o pH, corrigido para a faixa de 1,9 a 2,1 com NaOH 4N (Merck, Brasil). As amostras eram, então, centrifugadas a 3220 g por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante era filtrado em filtro de porosidade 0,45 μm (Millipore, EUA) antes da injeção na coluna cromatográfica.

Para cada rodada de análises uma nova curva de calibração era realizada, procedendo-se às diluições necessárias a partir de uma solução mãe contendo todos os aminoácidos de interesse (todos da marca Sigma, EUA). Feito isso, tomava-se 1mL de cada diluição e adicionava-se 0,6mL do reagente Lithium Diluent Li220 (Pickering Lab., EUA) e 0,4mL do padrão interno (D,L-Homocistima 0,25g/L). Cada padrão era então filtrado com membrana de porosidade 0,45µm (Millipore, Brasil). Os padrões obtidos tinham as seguintes concentrações (mg/L): 4,38 a 35 para Ácido Aspártico (A7219, Sigma, EUA); 4,38 a 35 para L-Asparagina (A7094, Sigma, EUA); 25 a 200 para L-Alanina (A3534, Sigma, EUA); 8,5 a 67,5 para L-Arginina.HCl (A6969, Sigma, EUA); 43,8 a 350 para L-Glutamina (Sigma); 46,3 a 370 para L-Histidina (H9386, Sigma, EUA); 0,625 a 5,0 para L-Isoleucina (I7403, Sigma, EUA); 0,938 a 7,5 para L-Leucina (L8912, Sigma, EUA); 7,81 a 62,5 para L-Lisina.HCl (L1262, Sigma, EUA); 0,625 a 5,0 para L-Metionina (A2893, Sigma, EUA); 1,88 a 15,0 para L-Fenilalanina (P5030, Sigma, EUA); 4,38 a 35 para L-Prolina (P0380, Sigma, EUA); 6,9 a 55 para L-Serina (Sigma); 2,2 a 17,5 para L-Treonina (T1645, Sigma, EUA); 1,25 a 10 para L-Triptofano (21110-028, Gibco, Invitrogen, EUA); 1,25 a 10 para L-Valina (V0513, Sigma, EUA); 0,375 a 3,0 para L-Cistina.2HCl (Sigma); 0,938 a 7,5 para L-Tirosina.2Na.2H₂O (T1145, Sigma, EUA); 37,5 a 300 para L-Ácido Glutâmico (G8415, Sigma, EUA); e 40,6 a 325 para Glicina (G6388, Sigma, EUA).

4.7.9 Determinação de vazões

As vazões das correntes de entrada e saída de meios nos ensaios em perfusão foram determinadas por duas maneiras distintas. A primeira está relacionada à montagem dos sistemas. As linhas que saiam dos frascos de alimentação e de descarte eram divididas em duas linhas paralelas com o auxílio de conectores em Y (Figura 4.5).

Em uma das linhas, antes da entrada na bomba, com o auxílio de um conector tipo T era colocada uma pipeta graduada que, com um suporte, ficava na posição vertical. Estas linhas permaneciam fechadas durante o ensaio.



Figura 4.5 - Esquema para determinação das vazões das correntes de entrada de saída do biorreator.

Para realizar as determinações das vazões, insuflavam-se os filtros colocados nas tampas dos frascos, com auxílio de uma pêra e abriam-se as linhas, onde estavam conectadas as pipetas. O líquido bombeado, obrigatoriamente, subia pela pipeta. Na sequência, interropiase o insuflamento e cronometrava o tempo necessário para o líquido escoar e atravessar duas marcações pré-estabelecidas da pipeta. Anotava-se o volume de líquido e o tempo da análise. O cálculo era efetuado através da Equação 4.4, onde:

$$\oint = \frac{\Delta V (mL)}{\Delta t (s)} \tag{4.4}$$

Após todo o escoamento total do líquido, fechava-se novamente esta linha.

Na segunda maneira, colocava-se o frasco em uma balança (modelo SB12001, Metler-Toledo, EUA), anotava-se a sua massa e disparava-se o cronômetro por um tempo definido, normalmente 60 s. Após este intervalo de tempo, anotava-se novamente a massa do frasco e procedia-se ao cálculo, através da equação 4.4. Neste método considerava-se que a densidade dos meios nas correntes de entrada e saída eram muito próximas à da água (1 g/mL), portanto a variação de massa e a variação do volume podiam ser considerados iguais.

4.7.10 Determinação dos volumes de ácido e base adicionados ao biorreator

Para determinar o volume de soluções transferidas ao biorreator, posicionava-se cada frasco em uma balança (Metler-Toledo) no início do ensaio e registrava-se a massa inicial do frasco com o líquido. Em intervalos de tempo determinados, procedia-se à leitura das massas dos frascos. A diferença entre as massas registradas em dois instantes distintos era atribuída ao volume adicionado, devido ao fato de se considerar, que a densidade das soluções eram muito próximas à densidade da água (1 g/mL).

4.7.11 Determinação do pH

O pH de uma solução era medido submergindo-se um eletrodo de pH (modelo 405, Metler-Toledo, EUA) na solução desejada. Este eletrodo estava conectado a um pHmetro (MP220, Metler-Toledo, EUA), o qual mostrava o valor lido.

O equipamento era calibrado diariamente com soluções padrão de pH 4,0 (1.09435.1000, Merck, Brasil) e 7,0 (1.09439.1000, Merck, Brasil).

4.7.12 Osmolalidade

A osmolalidade (mOsm/kg H₂O) foi determinada através do osmômetro Semi-micro K-7400 (Knauer, Alemanha), cujo princípio de operação baseia-se na medida do ponto de congelamento da solução, o qual é diretamente proporcional à osmolalidade da mesma. A leitura era feita a partir de alíquota de 150 μ L da amostra, em frasco do próprio do aparelho. O aparelho era calibrado antes de cada lote de amostra, com soluções padrão de osmolalidade, cuja faixa estava entre 0 e 600 mOsm/kg H₂O.

4.7.13 Determinação da atividade de rFVIII

A atividade de rFVIII foi medida pelo método de um estágio, que é baseado no tempo da ativação parcial da tromboplastina e recebe a denominação Tempo da Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa) ou do Inglês *activated Parcial Thromboplastin Time* (aPTT), utilizando o coagulômetro Start4 (Diagnostica Stago, França). Uma alíquota de 50 μ L de plasma deficiente (STA-Deficient VIII, 000743, Diagnostica Stago, França) em FVIII era aquecida a 37 °C por 30-45 s. Diluições das amostras (50 μ L) de sobrenadante dos cultivos eram adicionadas à cubeta (38876, Diagnostica Stago, França), seguidas da adição do reagente TTPa (50 μ L) (STA-PTT A, Diagnostica Stago, França) e submetido a 37 °C por 180 s. A coagulação era iniciada pela adição de uma solução de CaCl₂ 20mM (Diagonostica Stago, França) pré-aquecido a 37 °C e o tempo de formação do coágulo era medido. A curva

padrão era construída usando diluições de um *pool* de plasmas normais (STA-Unicalibrator, 000675, Diagnostica Stago, França). Eram feitos dois controles (patológico e normal) (STA System Control N+P, 000678, Diagnostica Stago, França) que apresentavam a resposta esperada. A regressão linear do tempo de coagulação *vs* o logaritmo da atividade foi usado para interpolar os tempos de coagulação observados.

4.8 Tratamento dos dados

Mediante a determinação das velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substratos e produção, bem como de fatores de conversão, foi possível identificar os fenômenos limitantes e/ou inibitórios controladores do crescimento celular e da síntese de proteína.

4.8.1 Alisamento dos dados

Para todos os dados apresentados referentes a crescimento celular, metabolismo e produção de rFVIII foi feita uma curva de alisamento com o auxílio de um *software* para tratamento de dados experimentais (Emerson), desenvolvido no Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) por Wagner Bruna e Manuel F. Barral, o qual fazia a interpolação dos dados utilizando um algoritmo de spline cúbica.

4.8.2 Determinação das velocidades específicas

A velocidade específica de crescimento, de consumo de substratos ou de síntese de produtos é definida pela equação 4.5:

$$\mu_i = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{di}{dt} \tag{4.5}$$

Onde, i refere-se às concentrações de células viáveis (Xv), substratos (S) ou produtos (P), t é o tempo de cultivo (horas) e μ_i é a velocidade específica da variável i (Xv, substrato ou produto ou subproduto).

No caso da velocidade específica de crescimento celular, realizou-se um tratamento preliminar dos dados de concentração celular, que consistia em identificar a existência de uma fase exponencial de crescimento mediante construção da figura $\ln Xv = f$ (t), através da

observação de um intervalo de tempo caracterizado por um comportamento linear, e obtinhase a equação desta reta, assumindo que os valores de Xv fornecidos por essa equação eram a melhor representação do crescimento celular no intervalo de tempo correspondente. Nesta fase, o valor de µx é máximo e constante, podendo ser calculado como o coeficiente angular da reta obtida.

4.8.3 Tempo de geração

O tempo de geração ou o tempo de duplicação da população é obtido na fase de crescimento exponencial através da equação 4.6:

$$t_{\rm G} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\rm X,Max}} \tag{4.6}$$

4.8.4 Fatores de conversão

Vários fatores de conversão de substratos a células, substratos a subprodutos e de células a subprodutos foram calculados neste estudo.

Os fatores globais de conversão de glicose à célula ($Y_{Xv/GLC}$), de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) e o fator global de produção de amônio por unidade de célula gerada ($Y_{NH4/Xv}$) foram calculados para cada condição experimental, durante a fase exponencial de crescimento como o coeficiente angular das curvas Xv=f(GLC), LAC=f(GLC) e de $NH_4^+=f(Xv)$, respectivamente. Em algumas condições, também foram calculados, durante a fase exponencial, os fatores de conversão globais de glutamina à célula ($Y_{Xv/GLN}$), de glutamina a amônio ($Y_{NH4/GLN}$), e o fator de produção de rFVIII por unidade de célula ($Y_{rFVIII/X}$), utilizando o coeficiente angular das curvas Xv=f(GLN), $NH_4^+=f(GLN)$ e Xv = f(rFVIII), respectivamente.

4.8.5 Produtividades em células e produto

A produtividade em células pode ser definida pela equação 4.7:

$$\Pi x = \frac{X \, final - X \, inicial}{t \, final - t \, inicial} \tag{4.7}$$

Onde:

- Πx: produtividade de células (cel/mL.h);
- Xfinal e Xinicial: concentração de células viáveis (cel/mL) nos instantes t final e tinicial, respectivamente.

De forma análoga, a produtividade em produto é definida pela equação 4.8:

$$\Pi rFVIII = \frac{rFVIII\ final - rFVIII\ inicial}{t\ final - t\ inicial}$$
(4.8)

Onde:

- IIrFVIII: produtividade em produto (UI/mL.h);
- rFVIII final e rFVIII inicial: concentração de fator VIII recombinante (UI/mL) nos instantes t final e tinicial, respectivamente.

$$\Pi X = \frac{X \ final - X \ inicial}{t \ final - t \ inicial} \tag{4.9}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios, os quais estão divididos em três partes: i) ensaios com a linhagem rHeLa; ii) ensaios preliminares para determinação de variáveis de operação; iii) ensaios com a linhagem rSKHep.

A complexidade do fator VIII acarreta em uma desvantagem crítica para o processo produtivo, que está relacionada à estabilidade da proteína. Desta forma, o processo deve ser altamente controlado para minimizar o tempo no qual a proteína é exposta a condições adversas. Os processos são, em geral, operados em batelada alimentada ou em contínuo com reciclo (perfusão). Para atingir o processo mais adequado de produção da proteína de interesse, nos estudos cinéticos com as linhagens rHeLa e rSKHep procurou-se identificar fenômenos limitantes, ocasionados pela carência de nutrientes, ou inibitórios, ocasionados por excesso de um substrato ou subproduto produzido, que controlam o crescimento e a expressão da proteína. Para tanto, foram definidos instantes críticos do cultivo, para os quais se identificavam valores característicos de variáveis de estado chaves e de grandezas cinéticas.

Os instantes críticos do cultivo utilizados para estas análises foram: o final da fase de crescimento lag (t_{LAG}), o final da fase de crescimento exponencial (t_{EXP}), o final do crescimento celular (t_{FIM}), o início da morte celular (t_{MORTE}). O instante mais importante analisado foi o t_{EXP} . Neste ponto específico, observavam-se os níveis dos principais nutrientes (glicose e aminoácidos, sendo a glutamina o mais importante) e dos principais inibidores (amônio e lactato) de sistemas que utilizam células animais. A intenção era encontrar correlações entre as concentrações destas variáveis de estado e os diferentes estágios do crescimento celular ou da expressão da proteína.

Determinaram-se, ainda, grandezas cinéticas a partir dos dados experimentais, que auxiliaram nesta análise de fenômenos e também na compreensão do metabolismo celular. São elas: a máxima produção de células (ΔX), a máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{X,MAX}$), o fator de conversão de glicose à células ($Y_{X/GLC}$), o fator de conversão de glutamina à células ($Y_{X/GLN}$), o fator de conversão de glicose à lactato ($Y_{LAC/GLC}$), o fator de conversão de glutamina à amônio ($Y_{NH4/GLN}$), o fator de produção de amônio por célula ($Y_{NH4/X}$) e o fator de produção de rFVIII por célula ($Y_{rFVIII/X}$).

A qualidade de qualquer estudo cinético depende diretamente da precisão das metodologias adotadas para as determinações analíticas e de grandezas cinéticas. Sempre que possível, neste trabalho adotou-se medidas que minimizassem os erros analíticos ou de

cálculos, ou pelo menos indicassem como a falta de controle sobre as variáveis poderia afetar a análise que se pretendia realizar. Em todos os experimentos procurou-se minimizar o efeito desse erro com o aumento da frequência de amostragem. As estimativas de erro de que dispomos são efetivamente valores de coeficiente de variação (CV=100%*DP/Média) para essas medidas analíticas, obtidas neste trabalho ou em trabalhos anteriores do grupo, entre elas podem-se destacar:

- erro nas medidas de concentração e viabilidade celular (erro determinado pelo grupo):
 15 a 20%. Procurou-se minimizar este erro, realizando todas as amostras em duplicata;
- nas análises cromatográficas, o custo da metodologia impossibilitou a realização das análises em duplicata. Para compensar, cada lote de amostras analisadas era sempre acompanhado de uma curva de calibração, construída a partir de diluições sucessivas de soluções padrões dos reagentes a serem analisados e da determinação das amostras de referência produzidas no laboratório para validação desta curva. O erro analítico das metodologias cromatográficas utilizadas é variável, sendo considerado da ordem de 5% para as medidas de glicose e lactato e de 15-20% para as medidas de aminoácidos (erro determinado pelo grupo);
- na medida de concentração de amônio também adotou-se a estratégia de validação das curvas de calibração mediante análises de amostras de referências produzidas no laboratório. O erro esperado era de 5-10% (erro determinado pelo grupo);
- nas regressões lineares utilizadas para os cálculos das velocidades específicas máxima de crescimento (μ_{X,MÁX}) e dos fatores de conversão (Y) foi usada a estratégia de maximização do coeficiente de correlação (r²) e na maioria dos cálculos o valor desta variável ficou acima de 0,9 (erro determinado neste trabalho);
- a medida do erro de atividade da proteína determinada pelo método TTPa era de 30% (erro determinado neste trabalho);
- nos ensaios do Tempo de Mistura, foram realizadas 3 repetições de algumas condições estudadas e o erro analítico obtido foi de 10% (erro determinado neste trabalho);
- nos ensaios do Planejamento Experimental com *spinfilter* externo, foram realizadas 6 repetições da mesma condição e o erro analítico obtido foi abaixo de 5% (erro determinado neste trabalho).

5.1 Estudos com a linhagem rHeLa

Uma linhagem celular transfectada para expressar o fator de coagulação VIII humano, supostamente uma HepG2FVIIIDBP140K (rHepG2), foi enviada ao IPT pelo seu parceiro neste projeto, o Hemocentro de Ribeirão Preto, no início das atividades. Segundo os pesquisadores desta instituição, esta linhagem havia sido totalmente caracterizada quanto: a) à presença do mRNA relativo ao FVIII por RT-PCR convencional ou sobre o nível de mRNA por RT-PCR em tempo real; b) à presença da proteína citoplasmática por citometria de fluxo; c) à presença da proteína no sobrenadante da cultura de células por "*western blot*" e d) à atividade biológica do rFVIII presente no sobrenadante destas culturas celulares pelo método de coagulação TTPa.

A primeira etapa dos estudos relativos ao desenvolvimento do processo de produção do rFVIII envolveu a adaptação desta linhagem celular humana, à condição de cultivo em suspensão, uma vez que esta era uma linhagem de células aderentes, e, na sequência, a adaptação em meios de cultura isentos de soro fetal bovino (SFB), condições consideradas mais adequadas para o escalonamento futuro do processo.

A partir de informações da literatura e da experiência das equipes do Hemocentro de Ribeirão Preto e do IPT foram estabelecidos protocolos para estas adaptações. Apesar do elevado grau de aleatoriedade destas atividades, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios e a linhagem foi adaptada à suspensão em 3 meios distintos, todos isentos de SFB.

Em seguida, foram realizados vários estudos cinéticos para caracterizar o metabolismo desta linhagem e possíveis fatores limitantes ou inibitórios do seu crescimento e síntese do produto. Estes estudos forneceram informações preliminares importantes para que se pudessem iniciar os cultivos em biorreator.

Os resultados preliminares de dosagem rFVIII permitiram a seleção do meio mais adequado para o processo e indicaram a necessidade de estudar suplementos ao meio de cultura, que permitissem maximizar a produção de rFVIII.

Porém, no decorrer deste quadro de ensaios, foram detectados problemas em relação a esta linhagem celular. Após a implementação de metodologias alternativas de quantificação de rFVIII pelo Hemocentro de Ribeirão Preto – Métodos Cromogênico e ELISA – constatouse que as respostas obtidas com as novas metodologias eram distintas das respostas obtidas até aquele momento pelo método de coagulação TTPa. As amostras dos cultivos apresentavam valores elevados de rFVIII pelo método TTPa, mas valores muito menores nos métodos alternativos (Cromogênico e ELISA).

Na busca de uma explicação, a equipe do Hemocentro de Ribeirão Preto realizou um estudo sobre a análise dos sítios de integração do FVIII-P140K desta linhagem celular. De maneira resumida, a Tabela 5.1 mostra os principais sítios de integração do FVIII recombinante nesta linhagem (dados fornecidos pela Dra. Aparecida Maria Fontes).

Sítios Genômicos	Suposta linhagem HepG2FVIIIDBP140K (%)
Unidades Transcricionais	52,0
Exons	6,0
Introns	94,0
MIR	16,6
LINES	33,3
\leq 5 Kb de ilhas CpGs	16,0
\leq 5 Kb de TFBS	3,6
Sítios Frágeis	20,0

 Tabela 5.1 - Sítios de integração do vetor retroviral pFMG-FVIII-p140K na suposta linhagem HepG2FVIIIDBP140K.

Pode-se observar uma preferência de integração em unidades transcricionais, regiões repetidas, ilhas CpG e sítios frágeis. Entre eles, convém ressaltar a alta frequência de sítios frágeis (20%). As regiões de sítio frágil apresentam instabilidade cromossômica e representam locais nos cromossomos metafásicos suscetíveis a quebras. Estas podem ser classificadas em dois grupos, sendo eles, comuns ou raros, de acordo com suas características e frequência em que são encontrados nos cromossomos. O vetor retroviral pMFG-FVIII-P140K apresentou integração no genoma da linhagem em ambos os grupos. Conforme mostra a Figura 5.1.

A integração ocorreu em 9 sítios frágeis, sendo os sítios mais frequentes FRA11G (5,35%) e FRA11B (5,35%) (Figura 5.1). Isso poderia explicar a perda do gene do FVIII na linhagem, após longos períodos de cultivo celular. Outra hipótese seria a ocorrência de alterações epigenéticas no DNA ou histonas da cromatina, em decorrência do tratamento da célula recombinante com um agente alquilante, o que poderia ter induzido o silenciamento gênico do mesmo. Ou seja, a enzima de reparo P140K presente no vetor não teria sido eficiente em reparar todas as metilações induzidas no DNA genômico pela droga, o que resultou no silenciamento gênico.



Figura 5.1 - Frequência de integração do vetor retroviral pMFG-FVIII-p140K em sítios frágeis do genoma da suposta linhagem HepG2FVIIIDBP140K. Fonte: Análise realizada pelo Hemocentro de Ribeirão Preto.

A grande demora em identificar essa perda de expressão ocorreu devido ao fato das células sintetizarem alguma substância desconhecida capaz de promover a coagulação no teste TTPa, com resultados elevados e promissores.

Para complementar este estudo, foi realizado em 2010, um Exame de Vínculo Genético (STR-*Fingerprint*), no qual verificou-se que a cultura rHepG2, na verdade era uma cultura de uma linhagem tumoral humana denominada HeLa. De acordo com a ATCC (2010) e outros trabalhos (CAPES-DAVIS et al., 2010; MASTERS, 2002), algumas de suas linhagens, inclusive algumas de HepG2, apresentam contaminação cruzada com células HeLa. Após este resultado, pode-se concluir que a linhagem modificada geneticamente para expressar o rFVIII tratava-se de uma rHeLa. Os dados indicados acima demonstram que a linhagem perdeu a capacidade de expressar a proteína, tornando-se pouco interessante do ponto de vista do processo. Neste momento, o quadro de ensaios com esta linhagem já estava muito avançado.

Na sequência, os pesquisadores do Hemocentro de Ribeirão Preto enviaram para o IPT uma nova linhagem de células humanas transfectadas (rSkHep) para produção de rFVIII, que havia sido caracterizada por eles com todos os testes já citados para a linhagem rHeLa, mas com o diferencial de que a atividade biológica da proteína recombinante podia ser quantificada por três métodos distintos (TTPa, Cromogênico e ELISA). Em seguida, foi realizado também no IPT um RT-PCR pela pesquisadora Dra. Patrícia Léo, para verificar se, efetivamente, o gene de produção de rFVIII estava inserido no genoma desta célula e obtevese resultado positivo. Os experimentos para definição da cinética de crescimento com a célula rHeLa continuaram, apesar desta linhagem não expressar de forma satisfatória o rFVIII, decidiu-se completar o referido estudo pelos motivos que se seguem:

- a) trata-se de uma célula humana, logo um modelo adequado para a implementação das técnicas de cultivo em perfusão, a serem utilizadas com a linhagem produtora (rSkHep) também humana. A expectativa era poder correlacionar os resultados dos estudos cinéticos entre as duas linhagens (rHela e rSKHep);
- b) há um interesse no estudo desta linhagem, pois a mesma é muito utilizada em pesquisas nas áreas da bioquímica à médica (FOUNTOLAKIS et al., 2004) e por ser o sistema modelo de célula cancerígena utilizado por pesquisadores dessa área (MASTERS, 2002);
- c) atualmente, vem sendo utilizada no controle de qualidade de fármacos, na expressão de diferentes vacinas e proteínas recombinantes (EL-ENSAHY et al., 2009), com diversos estudos disponíveis na literatura (BLECKWENN et al., 2005a, b; DAVIS et al., 1996; DESAINTES et al., 1997; HENDRICK et al., 2006; KIRSCH et al., 2003; MUSCHEL et al., 1991);
- d) já existe uma proteína recombinante, a Ang-1, expressa por esta linhagem, disponível comercialmente para utilização em pesquisa e uma patente de fator VII recombinante (WILSON et al., 2009).

Nos itens a seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos com a linhagem rHela.

5.1.1 Estudos preliminares em frascos T e Spinner

5.1.1.1 Estudos com meio de cultivo contendo SFB

5.1.1.1.1 Cinéticas de referência em frasco T

A figura 5.2 apresenta os resultados do estudo cinético do Ensaio 1 (Tabela 4.1), que são representativos da linhagem, quando cultivada em meio com SFB (Meio 1a, ver item 4.2), em frasco T.

A linhagem estudada apresentou um comportamento cinético semelhante ao de outras linhagens celulares de mamíferos dependentes de suporte: a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) foi de 0,028 h⁻¹, o que equivale a um tempo de geração de 24,8 h; há formação de subprodutos lactato (LAC) e amônio (NH₄⁺) (Figuras 5.2d e 5.2e, respectivamente), em decorrência do consumo de glicose (GLC) (Figura 5.2c) e glutamina (GLN) (dados não disponíveis), respectivamente; há o reconsumo de lactato (Figura 5.2d), quando a concentração de glicose atinge valor abaixo de 1 g/L (Figuras 5.2c), mas o mesmo não foi observado para o amônio (Figuras 5.2e).



Figura 5.2 - Resultados do Ensaio 1 (Tabela 4.1), alisados através do método spline. Linhagem rHeLa, Meio 1a, em frascos T. (a) Concentração e viabilidade celular; (b) Confluência; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; (f) pH. As linhas verticais indicam o instante no qual ocorre o fim da fase lag (preta tracejada), final da fase de crescimento exponencial (azul contínua), o fim do crescimento celular (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada).

A disponibilidade de área para adesão celular também é um fator essencial para o crescimento, uma vez que esta é uma linhagem aderente. A medida de confluência avalia o percentual da área ocupada em relação à área total disponível. Esta é uma medida subjetiva e está sujeita a erros. Os resultados obtidos mostram indícios de que a concentração celular (Figura 5.2a) aumenta quase 3 vezes depois de toda a área disponível ter sido ocupada (confluência 100%, Figura 5.2b).

O término da fase exponencial de crescimento, indicado como uma linha vertical azul na figura 5.2, em geral, é um indicativo de uma condição de limitação (carência nutricional ou de espaço para adesão) ou de inibição (acúmulo de substâncias tóxicas) do sistema. As hipóteses para o término da fase exponencial, com 93,5 horas são as seguintes:

- ausência de superfície para a adesão das células (confluência de 100%). Células dependentes de suporte podem apresentar "inibição por contato" quando há carência de superfície para adesão. O que não parece o caso, uma vez que a célula cresce por, aproximadamente, mais 50 horas em fase exponencial, depois de atingir 100% de confluência (Figuras 5.2a e 5.2b);
- inibição por amônio ou lactato, que atingiram valores de aproximadamente 100 mg/L e 2,5 g/L, respectivamente. Esses valores são suficientemente elevados para causar inibição em muitas linhagens celulares (AMABLE; BUTLER, 2008; CRUZ et al., 2000), no entanto, são necessários experimentos especialmente projetados para confirmar esse efeito sobre a linhagem estudada;
- limitação em glutamina é uma hipótese que, neste ensaio, não foi avaliada, em decorrência do número limitado de amostras analisadas. Entretanto, como se observa um patamar de concentrações de amônio após o término da fase exponencial, acreditase que a GLN tenha se esgotado. Esta correlação entre os perfis de GLN e NH4⁺ será mostrada em ensaios adiante;
- também é possível que ocorram vários efeitos simultaneamente.

Os resultados do Ensaio 2 (Tabela 4.1) foram considerados semelhantes aos do Ensaio 1, como pode ser observado nas tabelas 5.2 e 5.3. A produção celular na fase exponencial foi em média $1,3x10^6$ cel/mL (CV=14,1%), porém foram observadas algumas diferenças nos valores de $\mu_{X,MAX}$ e Y_{LAC/GLC}, que podem ter sido ocasionadas devido à diferença de 25% na concentração inicial dos dois ensaios.

	Nome no	Cond	ições Iniciais		Exponencial									
Ensaio Nº	Lab.	pН	X ₀ (cel/mL)	t_{LAG} (h)	$t_{EXP}(h)$	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	LAC (g/L)	GLN (mg/L)	$NH_4^+(mg/L)$		
1	TF8_1	7,40	1,20E+05	9,50	93,50	1,29E+06	1,17E+06	7,0	1,7	2,5	ND	107,9		
2	TF8_2	7,40	8,91E+04	0,00	98,50	1,52E+06	1,43E+06	7,1	1,8	1,8	ND	ND		
3	TF8_3	6,95	9,22E+04	0,00	90,67	1,13E+06	1,04E+06	6,6	3,3	0,5	ND	35,8		
4	TF8_4	7,28	1,11E+05	0,00	90,67	1,38E+06	1,27E+06	6,9	2,3	1,2	ND	44,7		
5	TF8_5	7,46	9,06E+04	0,00	115,00	1,74E+06	1,65E+06	6,9	0,5	2,3	ND	51,3		
6	TF8_6	7,69	1,03E+05	18,33	90,67	1,22E+06	1,11E+06	7,3	0,2	2,9	ND	47,0		
7	TF8_7	7,20	1,00E+05	0,00	90,67	1,48E+06	1,38E+06	6,9	2,5	1,2	ND	51,3		
8	TF8_8	7,20	1,14E+05	0,00	90,67	8,21E+05	7,07E+05	6,8	2,3	1,2	ND	47,0		

Tabela 5.2 - Valores das variáveis de estado dos ensaios realizados, nos instantes críticos do processo (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível), em frasco T.

	Nomeno	Condições Iniciais		Fim de crescimento								
Ensaio Nº	Lab.	pH	X ₀ (cel/mL)	t _{FIM} (h)	X (cel/mL)	ΔX (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	LAC (g/L)	GLN (mg/L)	NH_4 + (mg/L)	
1	TF8_1	7,40	1,20E+05	100,50	1,70E+05	1,58E+06	7,0	1,4	2,5	ND	112,4	
2	TF8_2	7,40	8,91E+04	118,00	1,80E+06	1,71E+06	6,9	1,0	1,9	ND	ND	
3	TF8_3	6,95	9,22E+04	115,00	1,34E+06	1,24E+06	6,5	3,0	0,6	ND	42,2	
4	TF8_4	7,28	1,11E+05	115,00	1,75E+06	1,64E+06	6,7	1,6	1,4	ND	50,7	
5	TF8_5	7,46	9,06E+04	162,00	1,97E+05	1,88E+06	6,7	0,0	1,6	ND	53,6	
6	TF8_6	7,69	1,03E+05	90,67	1,22E+06	1,11E+06	7,3	0,2	2,9	ND	47,0	
7	TF8_7	7,20	1,00E+05	90,67	1,48E+06	1,38E+06	6,5	2,5	1,2	ND	45,0	
8	TF8_8	7,20	1,14E+05	139,20	1,16E+06	1,05E+06	6,5	1,1	1,5	ND	56,0	

	Nomeno	Condi	ções Iniciais		Morte								
Ensaio Nº	Lab.	рН	Xv (cel/mL)	t _{MORTE} (h)	X (cel/mL)	ΔX (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	LAC (g/L)	GLN (mg/L)	$NH_4^+(mg/L)$		
1	TF8_1	7,40	1,20E+05	142,00	1,70E+06	1,58E+06	6,7	0,4	2,4	ND	103,6		
2	TF8_2	7,40	8,91E+04	141,50	1,80E+06	1,71E+06	6,7	0,2	2,1	ND	ND		
3	TF8_3	6,95	9,22E+04	115,00	1,34E+06	1,24E+06	6,5	3,0	0,6	ND	42,2		
4	TF8_4	7,28	1,11E+05	115,00	1,75E+06	1,64E+06	6,7	1,6	1,4	ND	50,7		
5	TF8_5	7,46	9,06E+04	-	-	-	-	-	-	ND	-		
6	TF8_6	7,69	1,03E+05	90,67	1,22E+06	1,11E+06	7,3	0,2	2,9	ND	47,0		
7	TF8_7	7,20	1,00E+05	139,20	1,48E+06	1,38E+06	6,5	1,2	1,4	ND	51,3		
8	TF8_8	7,20	1,14E+05	139,20	1,16E+06	1,05E+06	6,5	1,1	1,5	ND	56,0		

Ensaio Nº	Nome no Lab.	$\mu_{X,M\acute{A}X}(h^{-1})$	ΔX_{MAX} (cel/mL)	Y _{X/GLC} (cel/g)	Y _{LAC/GLC} (g/g)	Y _{NH4/X} (mg/ 10 ⁶ cel)
1	TF8_1	0,0280	1,58E+06	4,00E+08	0,725	9,34E-02
2	TF8_2	0,0339	1,71E+06	4,97E+08	0,569	ND
3	TF8_3	0,0284	1,24E+06	4,58E+08	0,491	5,94E-02
4	TF8_4	0,0296	1,64E+06	6,68E+08	0,556	3,01E-02
5	TF8_5	0,0266	1,88E+06	4,21E+08	0,594	2,92E-02
6	TF8_6	0,0325	1,11E+06	3,07E+08	0,715	2,86E-02
7	TF8_7	0,0303	1,38E+06	7,18E+08	0,531	3,04E-02
8	TF8_8	0,0259	1,05E+06	4,59E+08	0,644	5,86E-02

 Tabela 5.3 - Valores das grandezas cinéticas dos ensaios realizados em frasco T, calculados na fase exponencial de crescimento.

5.1.1.1.2 Estudo da influência do pH inicial em frascos T

A figura 5.3 apresenta os resultados do estudo sobre a influência do pH inicial da cultura no crescimento celular (Ensaios 2 a 6, Tabelas 4.1, 5.2 e 5.3). Apesar do tamponamento do meio por HEPES (Sigma, EUA), o valor do pH diminuiu com o crescimento celular em função da formação de ácido lático. A viabilidade celular se manteve acima de 95% em todos os ensaios.



Figura 5.3 - Influência do pH inicial da cultura sobre o crescimento celular (Ensaios 2 a 6, Tabela 4.1). Resultados alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLa, Meio 1a, em frascos T. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento para os Ensaios 2 (linha contínua preta), 3, 4 e 6 (linha contínua vermelha) e 5 (linha contínua azul). (a) Concentração celular; (b) pH. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

Os valores máximos de crescimento celular foram obtidos nos ensaios realizados com pH inicial de 7,28 a 7,46 (Figura 5.3a), uma faixa de valores considerada normal para cultivos

com células animais (BURGERNER; BUTLER, 2006). A partir deste estudo, todos os demais ensaios tiveram o pH inicial na faixa entre 7,2 e 7,4.

5.1.1.1.3 Estudo da influência da osmolalidade inicial em frascos T

A figura 5.4 indica os resultados obtidos no estudo da influência da osmolalidade do meio de cultura sobre o crescimento celular (Ensaios 4, 7 e 8, Tabelas 4.1, 5.2 e 5.3). Todos os ensaios tiveram pH inicial de aproximadamente 7,2. Em todos os casos os valores de viabilidade celular foram superiores a 95%. O aumento da osmolalidade implicou em redução do crescimento celular máximo, de aproximadamente 16 e 36%, nos valores de osmolalidade de 390 e 450 mOsm/kg, respectivamente, quando comparado ao maior crescimento obtido na faixa de 347 mOsm/kg. Estes valores correspondem àqueles observados por Zhu et al. (2005), que indicam uma faixa ótima de osmolalidade para o crescimento celular entre 270 a 330 mOsm/kg.



Figura 5.4 - Influência da osmolalidade do meio de cultura sobre o crescimento celular (Ensaios 4, 7 e 8, Tabela 4.1). Resultados alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLa, Meio 1a, em frascos T. (a) Concentração celular; (b) pH. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

5.1.1.1.4 Adaptação da linhagem ao crescimento em suspensão

Visando facilitar a ampliação de escala necessária para atingir o objetivo final do trabalho, que é o processo operado em modo perfusão, adaptou-se a linhagem rHeLa ao cultivo em suspensão.

A adaptação da linhagem celular foi realizada em frasco *Spinner*, por um período de aproximadamente 150 dias, empregando o mesmo Meio 1a (DMEM contendo 10% de soro

fetal bovino). A figura 5.5a mostra os perfis de crescimento, onde cada trecho linear representa um subcultivo, com seus valores inicial e final de concentração celular. A figura 5.5b indica os valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) e de tempo de geração (ou de duplicação), calculados a partir dos dados da figura 5.5a, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo. O valor médio $\mu_{X,MAX}$ foi de 0,025 ± 0,005 h⁻¹ (CV=19,7%), valor semelhante ao apresentado pelas células quando cultivadas em frasco T, condição de referência para este desenvolvimento (Tabela 5.2). O tempo de geração médio foi de 26,7 ± 4,7 h (CV=17,6%). A viabilidade celular (Figura 5.5c) se manteve acima de 90%, durante todo processo de adaptação. O fato de que os subcultivos apresentaram valores elevados de $\mu_{X,MAX}$, próximos do valor médio, ou seja, com baixo coeficiente de variação, desde o início dessa adaptação é uma indicação de que a adaptação à condição de suspensão foi relativamente fácil.



Figura 5.5 - Adaptação da linhagem celular rHela ao cultivo em suspensão, em frasco Spinner, com o Meio 1a. (a) Concentração celular (X_V); (b) Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{X,MÁX}) e tempo de geração (t_{GERAÇÃO}); (c) Viabilidade celular. As linhas horizontais da Figura 5.5b indicam os valores médios de μ_{X,MÁX} (azul contínua) e de tgeração (vermelha tracejada).

Na figura 5.5a estão indicados os instantes nos quais foram realizados os Ensaios 9 e 10 (Tabela 4.1), que são as cinéticas de referência para o cultivo em suspensão. No que se refere ao crescimento celular, ambos os ensaios são equivalentes, de forma que a produção máxima

de células foi em média $1,11 \times 10^6$ cel/mL (CV=10%) (Tabelas 5.4 e 5.5). Como exemplo da cinética observada nestes ensaios, a Figura 5.6 mostra os resultados do Ensaio 10. Quando se comparam estes resultados com aqueles relativos ao cultivo em frasco T (Figura 5.2), nota-se um crescimento celular 46% menor em *Spinner* (Tabelas 5.2 a 5.5). Uma possível explicação para este comportamento é o maior cisalhamento da condição agitada (*Spinner*) em relação à estática (frasco T).



Figura 5.6 - Resultados do Ensaio 10 (Tabela 4.1), alisados através do método spline. Linhagem rHeLaDMEMSp, Meio 1a, em frascos T. (a) Concentração e viabilidade celular; (b) Confluência; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; (f) pH. As linhas verticais indicam o instante no qual ocorre o final da fase exponencial de crescimento (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua).

O sistema apresentou crescimento exponencial até aproximadamente 92 h, indicado pela linha vertical azul na figura 5.6. Neste instante, não há carência de glicose (GLC~2,6 g/L) e

os níveis de LAC (~1,26 g/L) e NH₄⁺ (~53,75 mg/L) são inferiores aos observados no Ensaio 1 (Figuras 5.2d e 5.2e e Tabela 5.4), logo não parece haver inibição por esses subprodutos. Resta, portanto, a hipótese de que GLN tenha se esgotado, que é reforçada pelo fato do perfil de produção de NH₄⁺ ter se estabilizado a partir de 100 horas.

O metabolismo celular também apresenta comportamento ligeiramente distinto: apesar do menor crescimento em *Spinner* (Tabelas 5.2 a 5.5), o consumo de glicose foi bastante semelhante nos dois casos, apresentando um valor médio do fator de consumo de substrato $(Y_{X/GLC})$ de 3,89x10⁸ cel/g. A formação de lactato e de amônio foi maior nos cultivos em frasco T, apresentando valores de $Y_{LAC/GLC}$ e $Y_{NH4/X}$, 51 e 40% maiores, respectivamente, do que no cultivo em *Spinner* (Tabela 5.5).

 Tabela 5.4 - Valores das variáveis de estado dos ensaios realizados, nos instantes críticos do processo (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível), em *Spinner*. (continuação)

	Nome no	Condi	ções Iniciais		Exponencial							
Ensaio Nº	Lab.	pН	X ₀ (cel/mL)	t _{LAG} (h)	$t_{EXP}(h)$	X (cel/mL)	⊿X (cel/mL)	рН	GLC (g/L)	LAC (g/L)	GLN (mg/L)	$NH_4^+(mg/L)$
9	SpF8_1	7,40	9,53E+04	0,00	91,50	1,29E+06	1,19E+06	ND	ND	ND	ND	ND
10	SpF8_2	7,40	9,92E+04	0,00	92,50	1,10E+06	9,96E+05	7,11	2,40	1,26	ND	53,75
11	SpF8_3	7,40	2,01E+05	0,00	120,50	2,09E+06	1,89E+06	6,89	1,90	0,15	ND	60,23
12	SpF8_5	7,40	1,98E+05	0,00	122,50	2,05E+06	1,85E+06	7,26	2,38	1,07	ND	89,47
13	SpF8_6	7,40	2,17E+05	0,00	98,25	2,02E+06	1,80E+06	6,93	3,01	2,25	355,69	62,58
14	SpF8_4	7,40	1,26E+05	0,00	120,50	7,45E+05	6,19E+05	6,90	4,03	3,39	ND	47,74
15	SpF8_7	7,40	2,11E+05	0,00	123,00	3,60E+06	3,39E+06	7,16	0,92	1,68	24,60	55,24
16	SpF8_8	7,40	2,13E+05	0,00	122,50	2,27E+06	2,06E+06	7,04	1,04	2,32	ND	66,22
17	SpF8_9	7,40	1,93E+05	0,00	122,50	1,49E+06	1,30E+06	7,08	1,34	2,15	ND	83,96
18	SpF8_10	7,40	2,02E+05	0,00	115,00	6,15E+05	4,13E+05	7,01	1,81	2,16	ND	90,33
19	SpF8_12	7,40	1,85E+05	0,00	121,00	2,83E+06	2,64E+06	7,11	1,00	1,65	ND	69,73
20	SpF8_13	7,40	1,98E+05	17,17	121,00	2,18E+06	1,98E+06	7,15	1,30	1,88	ND	71,95
21	SpF8_14	7,40	1,97E+05	17,17	142,50	2,92E+06	2,72E+06	7,12	1,03	1,89	ND	64,45
22	SpF8_11	7,40	2,31E+05	0,00	97,67	1,92E+06	1,68E+06	6,85	1,63	2,04	ND	61,69
23	SpF8_15	7,40	1,80E+05	0,00	93,50	1,36E+06	1,18E+06	6,84	3,20	1,67	ND	47,90
24	SpF8_16	7,40	2,09E+05	0,00	93,50	1,54E+06	1,33E+06	6,87	3,37	2,50	ND	47,90
25	SpF8_17	7,40	2,15E+05	0,00	93,50	1,16E+06	9,44E+05	6,78	3,68	2,78	ND	50,97
26	SpF8_18	7,40	1,88E+05	0,00	93,50	1,20E+06	1,01E+06	6,81	3,63	1,83	ND	69,94
27	SpF8_19	7,40	1,88E+05	0,00	76,00	7,64E+05	5,76E+05	7,00	4,63	1,69	ND	45,26
28	SpF8_20	7,40	1,81E+05	0,00	77,00	1,37E+06	1,19E+06	6,92	3,33	2,22	77,03	65,00
29	SpF8_21	7,40	1,91E+05	0,00	77,00	1,02E+06	8,29E+05	6,92	3,78	2,36	44,12	68,10
30	SpF8_22	7,40	1,98E+05	0,00	93,50	1,02E+06	8,22E+05	6,87	3,42	2,50	3,91	80,72
31	SpF8_23	7,40	2,02E+05	21,50	93,50	4,36E+05	2,34E+05	7,03	4,35	1,99	86,61	63,41
32	SpF8_24	7,40	1,85E+05	0,00	94,00	1,72E+06	1,54E+06	6,93	3,67	2,77	ND	59,16
33	SpF8_25	7,40	1,81E+05	0,00	94,00	1,43E+06	1,25E+06	6,99	3,61	2,85	77,28	63,00
34	Spf8_20	7,40	1,80E+05	0,00	94,00	1,55E+06	1,3/E+06	6,98	3,44	2,22	ND	54.00
35	Spr8_2/	7,40	1,84E+05	0,00	94,00	1,39E+06	1,40E+06	0,95	4,20	3,29	140,10	54,99
30 27	Spro_20	7,40	1,95E+05	0,00	94,00	1,74E+00	1,04E+00	0,95	3,88	2,52	ND	54,99
3/	Spro_29 Spro_29	7,40	1,00E+05	0,00	95,50	1,23E+00	1,04E+00	6.76	3,02	1,50	ND 271-15	40,00
30	Spro_50	7,40	1,97E±05	21.00	03 50	1,20L+00	1,00L+00	6.78	1.06	1,00	68.24	42,00
33 40	Spro_31	7,40	1,04L+05	21,00	93,50	1,39L+00	1,21L+00	6,60	3 70	1,05	117 53	10.53
41	Spr0_52 SnF8 33	7,40	1,70L+05	21,00	93,50	1,09E+06	0,06E±05	6.74	3,10	1,50	387.08	-0,55 ND
42	Spr0_33	7,40	1,07E+05	0.00	72 50	1,07E+00	9,52E±05	6 00	ND	ND	ND	ND
43	SpF8_35	7,40	1,94E+05 1.87E+05	0,00	94 50	1,13E+00	1.61E+06	6.81	ND	ND	ND	ND
43	SnF8 36	7.40	1,07E+05	0,00	94 50	1,00±100	1,51E+06	6 74	ND	ND	ND	ND
45	SpF8 41	7.40	1.84E+05	0.00	99,50	1,43E+06	1,24E+06	6.94	3,78	2.43	ND	68.07
46	SpF8 42	7.40	2,16E+05	0.00	76.50	1.07E+06	8.63E+05	6.82	0.11	2,52	ND	65.52
47	SpF8 43	7.40	1.88E+05	23.00	99.50	1.72E+06	1,53E+06	6.94	3,90	2,44	ND	69.50
48	SpF8_44	7,40	1,99E+05	0,00	70,50	1,10E+06	9,06E+05	6,85	4,65	2,10	ND	55,88

 Tabela 5.4 - Valores das variáveis de estado dos ensaios realizados, nos instantes críticos do processo (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível), em *Spinner*. (continuação)

	Nome no	Condi	ções Iniciais	iais Fim de crescimento							
Ensaio Nº	Lab.	pН	Xv (cel/mL)	$t_{FIM}(h)$	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	pН	GLC (g/L)	LAC (g/L)	GLN (mg/L)	$NH_4^+(mg/L)$
9	SpF8_1	7,40	9,53E+04	143,00	1,29E+06	1,19E+06	ND	ND	ND	ND	ND
10	SpF8_2	7,40	9,94E+04	98,50	1,13E+06	1,03E+06	7,09	2,23	1,32	ND	ND
11	SpF8_3	7,40	2,01E+05	120,50	2,09E+06	1,89E+06	6,89	1,90	0,15	ND	60,23
12	SpF8_5	7,40	1,98E+05	122,50	2,05E+06	1,85E+06	7,26	2,38	1,07	ND	89,47
13	SpF8_6	7,40	2,17E+05	98,25	2,02E+06	1,80E+06	6,93	3,01	2,25	355,69	62,58
14	SpF8_4	7,40	1,26E+05	120,50	7,45E+05	6,19E+05	6,90	4,03	3,39	ND	47,74
15	SpF8_7	7,40	2,11E+05	188,50	7,15E+06	6,94E+06	7,38	0,00	0,73	24,60	49,54
16	SpF8_8	7,40	2,13E+05	122,50	2,27E+06	2,06E+06	7,04	1,04	2,32	ND	66,22
17	SpF8_9	7,40	1,93E+05	122,50	1,49E+06	1,30E+06	7,08	1,34	2,15	ND	83,96
18	SpF8_10	7,40	2,02E+05	115,00	6,15E+05	4,13E+05	7,01	1,81	2,16	ND	90,33
19	SpF8_12	7,40	1,85E+05	210,00	6,04E+06	5,85E+06	7,19	0,00	0,66	ND	56,85
20	SpF8_13	7,40	1,98E+05	186,50	3,91E+06	3,71E+06	7,08	0,00	1,57	ND	57,73
21	SpF8_14	7,40	1,97E+05	186,50	3,70E+06	3,50E+06	7,07	0,00	1,42	ND	55,65
22	SpF8_11	7,40	2,31E+05	143,00	2,64E+06	2,41E+06	6,92	0,00	2,95	ND	69,73
23	SpF8_15	7,40	1,80E+05	143,00	2,19E+06	2,01E+06	6,81	2,29	1,32	ND	56,28
24	SpF8_16	7,40	2,09E+05	143,00	2,43E+06	2,22E+06	6,77	2,28	2,60	ND	51,92
25	SpF8_17	7,40	2,15E+05	143,00	2,14E+06	1,93E+06	6,79	2,80	2,91	ND	57,39
26	SpF8_18	7,40	1,88E+05	143,00	2,03E+06	1,84E+06	6,77	2,34	1,30	ND	59,71
27	SpF8_19	7,40	1,88E+05	143,00	1,47E+06	1,28E+06	6,75	3,00	1,72	ND	64,62
28	SpF8_20	7,40	1,81E+05	145,50	1,84E+06	1,66E+06	6,78	2,57	2,49	ND	79,39
29	SpF8_21	7,40	1,91E+05	145,50	1,38E+06	1,19E+06	6,82	2,25	2,90	ND	92,50
30	SpF8_22	7,40	1,98E+05	120,00	1,13E+06	9,32E+05	6,84	2,28	2,72	3,91	84,10
31	SpF8_23	7,40	2,02E+05	145,50	9,05E+05	7,03E+05	6,86	2,64	2,25	ND	84,03
32	SpF8_24	7,40	1,85E+05	113,50	2,24E+06	2,06E+06	6,84	2,66	2,72	ND	59,16
33	SpF8_25	7,40	1,81E+05	113,50	2,08E+06	1,90E+06	6,86	3,21	2,89	31,90	63,27
34	SpF8_26	7,40	1,80E+05	120,25	1,94E+06	1,76E+06	6,88	3,28	2,45	ND	77,08
35	SpF8_27	7,40	1,84E+05	140,00	2,92E+06	2,73E+06	6,86	2,37	2,65	ND	67,93
36	SpF8_28	7,40	1,95E+05	140,00	2,32E+06	2,12E+06	6,87	1,85	2,03	ND	75,35
37	SpF8_29	7,40	1,86E+05	121,00	1,64E+06	1,45E+06	6,80	2,31	0,92	ND	44,26
38	SpF8_30	7,40	1,97E+05	121,00	1,41E+06	1,21E+06	6,74	2,10	1,05	159,08	57,84
39	SpF8_31	7,40	1,84E+05	121,00	1,58E+06	1,40E+06	6,82	3,21	1,63	34,12	41,52
40	SpF8_32	7,40	1,90E+05	121,00	1,10E+06	9,11E+05	6,67	3,34	1,12	93,77	42,00
41	SpF8_33	7,40	1,8/E+05	100,83	1,15E+06	9,65E+05	6,71	3,80	1,53	308,51	ND
42	SpF8_34	7,40	1,94E+05	115,50	1,82E+06	1,63E+06	6,/6	ND	ND	ND	ND
43	SpF8_35	7,40	1,8/E+05	115,50	2,2/E+06	2,09E+06	6,81	ND	ND	ND	ND
44	SpF8_36	7,40	1,98E+05	115,50	2,24E+06	2,04E+06	6,79	ND	ND	ND	ND
45	Spr8_41	7,40	1,84E+05	14/,/0	2,02E+06	1,83E+06	6,77	2,86	2,44	ND	13,48
40	Spr8_42	7,40	2,10E+05	/0,50	1,0/E+06	8,03E+U3	0,82	0,11	2,52	ND	00,02
47	Spr8_43	7,40	1,88E+05	14/,6/	2,23E+06	2,04E+06	6,94	2,62	2,56	ND	15,21
48	Spr8_44	7,40	1,99E+05	/6,50	1,13E+06	9,37E+05	6,86	4,45	2,46	ND	58,08

 Tabela 5.4 - Valores das variáveis de estado dos ensaios realizados, nos instantes críticos do processo (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível), em *Spinner*. (conclusão)

	Nomeno	Condi	ções Iniciais					Morte			
Ensaio Nº	Nome no Lab.	pН	Xv (cel/mL)	t _{MORTE} (h)	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	рН	GLC (g/L)	LAC (g/L)	GLN (mg/L)	$NH_4^+(mg/L)$
9	SpF8_1	7,40	9,53E+04	143,00	1,29E+06	1,19E+06	ND	ND	ND	ND	ND
10	SpF8_2	7,40	9,94E+04	98,50	1,13E+06	1,03E+06	7,09	2,23	1,32	ND	ND
11	SpF8_3	7,40	2,01E+05	142,00	2,02E+06	1,82E+06	6,60	1,40	0,14	ND	73,10
12	SpF8_5	7,40	1,98E+05	122,50	2,05E+06	1,85E+06	7,26	2,38	1,07	ND	89,47
13	SpF8_6	7,40	2,17E+05	122,50	1,93E+06	1,71E+06	6,9	2,5	2,13	324,99	62,58
14	SpF8_4	7,40	1,26E+05	120,50	7,45E+05	6,19E+05	6,90	4,03	3,39	ND	47,74
15	SpF8_7	7,40	2,11E+05	194,50	6,98E+06	6,76E+06	7,38	0,00	0,23	ND	53,27
16	SpF8_8	7,40	2,13E+05	143,00	2,13E+06	1,92E+06	6,99	0,65	2,34	ND	63,86
17	SpF8_9	7,40	1,93E+05	122,50	1,49E+06	1,30E+06	7,08	1,34	2,15	ND	83,96
18	SpF8_10	7,40	2,02E+05	143,00	5,90E+05	3,88E+05	7,00	1,39	2,23	ND	90,33
19	SpF8_12	7,40	1,85E+05	210,00	6,04E+06	5,85E+06	7,19	0,00	0,66	ND	56,85
20	SpF8_13	7,40	1,98E+05	186,50	3,91E+06	3,71E+06	7,08	0,00	1,57	ND	57,73
21	SpF8_14	7,40	1,97E+05	186,50	3,70E+06	3,50E+06	7,07	0,00	1,42	ND	55,65
22	SpF8_11	7,40	2,31E+05	169,50	2,42E+06	2,19E+06	6,86	0,00	2,76	ND	69,65
23	SpF8_15	7,40	1,80E+05	143,00	2,19E+06	2,01E+06	6,81	2,29	1,32	ND	56,28
24	SpF8_16	7,40	2,09E+05	143,00	2,43E+06	2,22E+06	6,77	2,28	2,60	ND	51,92
25	SpF8_17	7,40	2,15E+05	143,00	2,14E+06	1,93E+06	6,79	2,80	2,91	ND	57,39
26	SpF8_18	7,40	1,88E+05	143,00	2,03E+06	1,84E+06	6,77	2,34	1,30	ND	59,71
27	SpF8_19	7,40	1,88E+05	143,00	1,47E+06	1,28E+06	6,75	3,00	1,72	ND	64,62
28	SpF8_20	7,40	1,81E+05	145,50	1,84E+06	1,66E+06	6,78	2,57	2,49	3,91	79,39
29	SpF8_21	7,40	1,91E+05	145,50	1,38E+06	1,19E+06	6,82	2,25	2,90	ND	92,50
30	SpF8_22	7,40	1,98E+05	120,00	1,13E+06	9,32E+05	6,84	2,28	2,72	3,91	84,10
31	SpF8_23	7,40	2,02E+05	145,50	9,05E+05	7,03E+05	6,86	2,64	2,25	ND	84,03
32	Spf8_24	7,40	1,85E+05	140,00	2,13E+06	1,94E+06	6,83	2,43	2,93	ND	56,97
33	Spr8_25	7,40	1,81E+05	120,25	1,30E+06	1,34E+06	0,83	3,08	2,91	24,10	0/,81
34 25	Sprð_20	7,40	1,80E+05	140,00	1,89E+00	1,/1E+00	0,81	3,00	2,87	ND	(7.02
35	Spro_2/	7,40	1,84E+05	140,00	2,92E+06	2,73E+00	0,80	2,57	2,00	ND	07,95
30 37	Spro_20	7,40	1,95E+05	121.00	2,52E+00	2,12E+00	6.80	1,05	2,05	ND	13,55
38	Spro_23 SpF8_30	7,40	1,00E+05	121,00	1,04E+00	1,4JE+00	6.74	2,51	1.05	150.08	57.84
30	Spro_30	7,40	1,97E+05	121,00	1,41E+00	1,21E+00	6.82	3.21	1,05	34.12	41 52
3) 40	Spr0_31 SnF8 32	7,40	1,04E+05	121,00	1,0E+06	9.11E+05	6,62	3 34	1,05	93 77	42.00
41	SnF8 33	7,40	1,90E+05	100.83	1,10E+06	9.65E+05	671	3.80	1,12	308 51	ND
42	SpF0_33	7,40	1,07E+05	115 50	1,13E+06	1.63E+06	676	5,00 ND	ND	ND	ND
43	SpF8_35	7 40	1,91E+05	143.00	2 14E+06	1,05±+06	6 79	ND	ND	ND	ND
44	SpF8_36	7,40	1,98E+05	115,50	2.24E+06	2.04E+06	6.79	ND	ND	ND	ND
45	SpF8 41	7.40	1,84E+05	147.70	2.02E+06	1.83E+06	6.77	2.86	2.44	ND	73.48
46	SpF8 42	7.40	2,16E+05	76.50	1.07E+06	8.63E+05	6.82	0.11	2.52	ND	65.52
47	SpF8 43	7.40	1,88E+05	147.67	2,23E+06	2,04E+06	6,94	2.62	2,56	ND	73,27
48	SpF8_44	7,40	1,99E+05	76,50	1,13E+06	9,37E+05	6,86	4,45	2,46	ND	58,08

Ensaio Nº	Nome no Lab.	$\mu_{X,M\dot{A}X}(h^{-1})$	ΔX _{MÁX} (cel/mL)	Y _{X/GLC} (cel/g)	Y _{LAC/GLC} (g/g)	Y _{NH4/GLN} (g/g)	Y _{X/GLN} (cel/g)	Y _{NH4/X} (mg/ 10 ⁶ cel)
9	SpF8_1	0,0292	1,19E+06	ND	ND	ND	ND	ND
10	SpF8_2	0,0248	1,03E+06	3,78E+08	0,48	ND	ND	6,62E-02
11	SpF8_3	0,0192	1,89E+06	1,01E+09	1,005	ND	ND	2,74E-02
12	SpF8_5	0,0183	1,85E+06	8,10E+08	0,514	ND	ND	3,15E-02
13	SpF8_6	0,0217	1,80E+06	2,68E+08	0,540	7,80	4,70E+06	3,58E-02
14	SpF8_4	0,0155	6,19E+05	1,18E+08	0,840	ND	ND	4,75E-02
15	SpF8_7	0,0231	6,94E+06	1,11E+09	0,372	9,11	7,44E+06	9,00E-03
16	SpF8_8	0,0193	2,06E+06	6,51E+08	0,607	ND	ND	1,30E-02
17	SpF8_9	0,0164	1,30E+06	4,89E+08	0,699	ND	ND	1,30E-02
18	SpF8_10	0,0100	4,13E+05	1,79E+08	0,870	ND	ND	2,02E-02
19	SpF8_12	0,0245	5,85E+06	1,14E+09	0,503	ND	ND	1,40E-02
20	SpF8_13	0,0234	3,71E+06	7,55E+08	0,565	ND	ND	1,10E-02
21	SpF8_14	0,0220	3,50E+06	7,70E+08	0,601	ND	ND	1,32E-02
22	SpF8_11	0,0222	2,41E+06	6,05E+08	0,680	ND	ND	3,99E-02
23	SpF8_15	0,0253	2,01E+06	2,95E+08	0,507	ND	ND	3,51E-02
24	SpF8_16	0,0229	2,22E+06	3,91E+08	0,614	ND	ND	2,62E-02
25	SpF8_17	0,0199	1,93E+06	2,86E+08	0,858	ND	ND	3,84E-02
26	SpF8_18	0,0216	1,84E+06	2,47E+08	0,638	ND	ND	4,55E-02
27	SpF8_19	0,0204	1,28E+06	2,19E+08	0,547	ND	ND	6,11E-02
28	SpF8_20	0,0263	1,66E+06	2,79E+08	0,529	11,2	1,81E+06	4,76E-02
29	SpF8_21	0,0214	1,19E+06	2,02E+08	0,623	11,7	1,13E+06	6,57E-02
30	SpF8_22	0,0168	9,32E+05	2,00E+08	0,708	8,2	1,34E+06	9,00E-02
31	SpF8_23	0,0100	7,03E+05	9,92E+07	0,697	10,9	5,80E+05	1,68E-01
32	SpF8_24	0,0246	2,06E+06	3,70E+08	0,679	ND	ND	3,26E-02
33	SpF8_25	0,0226	1,90E+06	3,29E+08	0,820	14,2	1,65E+06	3,80E-02
34	SpF8_26	0,0235	1,76E+06	3,40E+08	0,720	ND	ND	3,47E-02
35	SpF8_27	0,0243	2,73E+06	3,34E+08	0,576	11,8	2,35E+06	3,43E-02
36	SpF8_28	0,0246	2,12E+06	3,26E+08	0,595	ND	ND	2,84E-02
37	SpF8_29	0,0237	1,45E+06	2,40E+08	0,514	ND	ND	3,31E-02
38	SpF8_30	0,0237	1,21E+06	2,80E+08	0,426	7,4	3,37E+06	3,17E-02
39	SpF8_31	0,0249	1,58E+06	2,60E+08	0,249	15,4	2,92E+06	3,91E-02
40	SpF8_32	0,0220	9,11E+05	2,08E+08	0,203	21,4	1,16E+06	2,66E-02
41	SpF8_33	0,0188	9,65E+05	1,60E+08	0,198	ND	3,01E+06	ND
42	SpF8_34	0,0247	1,63E+06	ND	ND	ND	ND	ND
43	SpF8_35	0,0242	2,09E+06	ND	ND	ND	ND	ND
44	SpF8_36	0,0232	2,04E+06	ND	ND	ND	ND	ND
45	SpF8_41	0,0220	1,83E+06	4,93E+08	0,629	ND	ND	3,80E-02
46	SpF8_42	0,0219	8,63E+05	2,70E+08	0,660	ND	ND	7,55E-02
47	SpF8_43	0,0235	2,04E+06	5,62E+08	0,604	ND	ND	3,01E-02
48	SpF8_44	0,0252	9,37E+05	2,57E+08	0,692	ND	ND	7,03E-02

 Tabela 5.5 - Valores das grandezas cinéticas de todos os ensaios realizados em Spinner, calculados na fase exponencial de crescimento.

5.1.1.2 Adaptação da linhagem celular a meios de cultura isentos de SFB

Com as células já adaptadas ao crescimento em suspensão, procurou-se adaptá-las a meios isentos de soro (ver itens 3.2 e 4.2). Foram avaliados os meios denominados 3 a 10 (ver item 4.2 e Tabela 4.2), de diferentes fabricantes, com formulações indicadas como "isentas de soro", "isentas de proteína animal" ou "quimicamente definidas". As tentativas de adaptação

aos Meios 3, 4, 6, 7 e 9 foram realizadas a partir das células adaptadas ao cultivo em suspensão, em meios contendo SFB (Meio 1a-DMEM10% ou Meio 2-BD10%). Em todos os casos a adaptação seguiu um procedimento de redução gradual do SFB. No caso dos Meios 5, 8 e 10, o processo de adaptação iniciou-se a partir de células adaptadas ao Meio 4 (Si-ACF), já isento de soro e seguiu o mesmo protocolo de troca gradual de um meio por outro.

O mesmo tipo de análise, já apresentado na figura 5.5, foi aplicado às adaptações mencionadas acima. A título de exemplo, a figura 5.7 mostra os resultados da adaptação ao Meio 6a. No 14° dia as células já estavam sendo cultivadas em meio isento de SFB (Figura 5.7d) e o que se observa são valores de $\mu_{X,MAX}$ (Figura 5.7b) bastante estáveis, indicando que o processo de adaptação tivera sucesso.



Figura 5.7 - Adaptação da linhagem rHela ao Meio 6a, isento de soro em frasco Spinner.
(a) Concentração celular (X_V); (b) Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{X,MÁX}) e tempo de geração (t_{GERAÇÃO}); (c) Viabilidade celular; (d) Porcentagem de soro fetal bovino (SFB) no cultivo. As linhas horizontais da Figura. 5.7b indicam os valores médios de μ_{X,MÁX} (azul) e de t_{GERAÇÃO} (vermelho).

A tabela 5.6 indica os principais resultados dos processos de adaptação que obtiveram sucesso (Meios 4, 6a e 9), caracterizado por baixos coeficientes de variação para os valores de

 $\mu_{X,MAX}$ e com uma viabilidade celular sempre superior a 90% (Figura 5.7c). Pode-se observar que, em todas as adaptações, foram obtidos valores de $\mu_{X,MAX}$ menores do que aqueles obtidos nos ensaios em frascos T com o Meio 1a, como já havia sido observado no item 5.1.1.1.4 (adaptação à suspensão).

No caso do Meio 7, obteve-se um sucesso parcial. As células foram subcultivadas por 9 passagens com baixo percentual de SFB (inferior a 0,3%) e por mais 6 passagens em ausência total de SFB. Durante esse período, o comportamento da cultura era relativamente estável, com valores médios de $\mu_{X,MAX}$ da ordem de 0,015±0,007 h⁻¹ e viabilidade celular acima de 85%. Após esse período, a linhagem foi incapaz de crescer em *Spinner*, apresentando resultados positivos apenas em frasco T.

-	IIIeL	<i>la</i> , em mas	scos spinner.							
Main	J K	Condiçã	o mínima de SFB	ł	$\mu_{X,MAX}$ (h ⁻¹)	X _{MÁX} (cel/mL) (medido com 48h de cultivo)			
Meio	de cultura	% SFB	N ^o de repiques	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV ^(*) (%)	
4	Si-ACF	0	30	0,017	0,0040	23,4	4,24.10 ⁵	2,4.10 ⁴	6,7	
ба	HyCD_a	0	36	0,025	0,0039	15,5	7,69.10 ⁵	1,6.10 ⁵	21,6	
9	HySF	0	23	0,026	0,0033	12,6	6,72.10 ⁵	1,0.10 ⁵	19,3	
(*) CV - 1	OO. DP									

 Tabela 5.6 - Quadro resumo das adaptações a meios de cultura isentos de SFB da linhagem rHeLa, em frascos Spinner.

*) $CV = 100 \cdot \frac{DP}{Média}$

5.1.1.2.1 Cinéticas de crescimento em diferentes meios de cultivo isentos de soro

Após a adaptação da linhagem aos Meios 4, 6a e 9 (isentos de SFB), foram realizados estudos cinéticos, em *Spinner*, no sentido de avaliar o crescimento e o metabolismo das células nestas condições. A figura 5.8 apresenta uma comparação do desempenho das células nestes meios em relação ao Meio 1a, o qual é considerado uma referência para este desenvolvimento.

O crescimento celular (Figura 5.8a) variou bastante entre os meios isentos de SFB (HySF, Si-ACF e HyCD_a, Ensaios 11, 12, 13 e 15, Tabela 4.3). Em todos os casos, o crescimento celular foi claramente superior àquele observado no meio contendo SFB (Ensaio 10, Tabela 4.1) (Tabelas 5.4 e 5.5). Entretanto, o valor máximo de concentração celular no Ensaio 15, em meio Si-ACF (Meio 4), é muito superior (3,5x) aos demais meios isentos de SFB. Acredita-se que o Ensaio 12, também realizado em meio Si-ACF, atingiria resultados

semelhantes se não tivesse sido interrompido prematuramente, visto que o volume de cultura no frasco já era muito baixo e não permitia a correta homogeneização do mesmo.

O maior crescimento celular não parece ter ocorrido em decorrência da maior disponibilidade de glicose, uma vez que a concentração inicial deste substrato é muito semelhante para todos os meios utilizados. No entanto, o Meio 4 apresenta a maior concentração inicial de glutamina dentre os meios testados (Tabela 5.7), o que pode ter sido um fator determinante para o maior crescimento celular obtido. Além disso, deve-se destacar que este é um meio com formulação fechada, de forma que outros componentes desconhecidos (como vitaminas, fatores de crescimento, etc) podem ter influenciado neste resultado.

De modo geral, pode-se observar na tabela 5.7, que a composição de aminoácidos é bem variável (dados obtidos a partir de análises realizadas no laboratório), apresentando variações de até 300 % entre os valores de concentração de um mesmo aminoácido em diferentes meios de cultura. Para cada meio isento de SFB, foi calculada a modificação na composição de aminoácidos em relação ao meio considerado como referência. De forma geral, esses meios isentos de SFB são mais ricos em aminoácidos que o meio DMEM10%_a (ver valor total em mg/L na Tabela 5.7) e em todos os casos constatam-se maiores concentrações de GLN, o aminoácido de maior consumo na maioria dos processos com células animais.

Os diferentes perfis de síntese de subprodutos (LAC e NH_4^+) observados nas figuras 5.8d e 5.8e também podem ser atribuídos às diferenças na formulação destes meios de cultivo. A maior formação de LAC no ensaio com o meio HyCD_a (Meio 6a) (Figura 5.8d) é consequência da maior disponibilidade de GLC neste meio. A concentração de LAC obtida neste ensaio (~2,2 g/L) pode ser considerada alta (CRUZ et.al, 2000) e o cultivo pode ter sido inibido por esse subproduto. Para os demais meios de cultura, que apresentam a mesma disponibilidade inicial de GLC, os valores máximos de LAC ficaram entre 1,0 e 1,5 g/L e não parecem exercer efeito de inibição. Analogamente ao já discutido para os meios contendo SFB, o reconsumo de LAC também foi observado em vários destes estudos, quando GLC atingiu concentrações muito baixas.



Figura 5.8 - Resultados alisados através do método *spline*, das cinéticas de crescimento das subpopulações da linhagem rHeLa (rHeLaHySFSp, rHeLaHyCDSp e rHeLaHySiACFSp), em diferentes meios de cultura isentos de SFB (HySF: Ensaio 11; Si-ACF: Ensaios 12 e 15; HyCD_a: Ensaio 13, Tabela 4.3), respectivamente. Comparados com a condição de referência da linhagem rHeLa (DMEM10%_a: Ensaio 10, Tabela 4.1) em frasco *Spinner*. (a) Concentração celular; (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; e (f) pH. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento nos Ensaios 10 (vermelha contínua), 11 (azul contínua). 12 e 15 (as linhas contínua e tracejada pretas estão sobrepostas) e 13 (vermelha tracejada). (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

Aminoácido	DMEM10%_a (Meio 1a)	Si-ACF	(Meio 4)	HyCD_a	(Meio 6a)	HySF (Meio 9)	
Ammoacido	Medido	Medido	Alteração	Medido	Alteração	Medido	Alteração
	(mg/L)	(mg/L)	(%)	(mg/L)	(%)	(mg/L)	(%)
Glicina	34,4	28,5	-17,2	46,1	33,9	28,1	-18,3
L-Alanina	11,3	25,1	122,0	31,9	181,9	50,2	343,2
L-Arginina.HCl	61,4	289,1	370,7	1620,0	2539	107,4	74,9
L-Cistina	34,4	88,2	156,2	53,3	55,0	38,1	10,8
L-Fenilalanina	80,3	138,2	72,1	103,0	28,3	91,7	14,1
L-Glutamina	552,3	1047,1	89,6	880,5	59,4	746,0	35,1
L-	121.2	02.5	20.0	00.7	22.0		40.2
Histidina.HCl.H ₂ O	151,5	95,5	-28,8	88,2	-32,8	00,3	-49,5
L-Isoleucina	106,5	162,0	52,0	252,1	136,7	102,5	-3,8
L-Leucina	110,8	216,5	95,4	219,2	97,8	156,1	40,9
L-Lisina.HCl	44,7	188,2	320,8	174,2	289,6	89,8	100,7
L-Metionina	32,9	62,0	88,5	88,9	170,4	29,1	-11,4
L-Prolina	0,0	23,5	-	18,9	-	37,9	-
L-Serina	41,4	137,2	231,9	191,5	363,0	100,6	143,3
L-Tirosina	122,9	217,1	76,7	131,8	7,2	59,3	-51,8
L-Treonina	128,7	194,4	51,0	106,6	-17,2	38,4	-70,1
L-Triptofano	6,9	25,3	265,8	9,0	30,5	7,4	6,7
L-Valina	97,8	156,4	59,8	101,0	3,2	47,1	-51,9
Total (mg/L)	1598,0	3092,0	-	4117,0	-	1796,0	-

 Tabela 5.7 - Composição de aminoácidos dos meios empregados neste estudo e a alteração na concentração de cada item em relação ao Meio 1a, obtidas a partir de análises realizadas no laboratório do IPT.

^(*) Alteração = $\frac{[Aa]_{Meio} - [Aa]_{DMEM}}{[Aa]_{DMEM}} *100$

A formação de amônio (Figura 5.8e) não apresentou uma correlação tão inequívoca com a quantidade de aminoácidos disponíveis no meio. Esperava-se que os meios contendo maiores quantidades de GLN, gerassem as maiores concentrações de amônio. É verdade que o Ensaio 12, realizado com o Meio 4, atende essa expectativa. Entretanto, o Ensaio 15, realizado com o mesmo meio de cultura, não produziu as mesmas quantidades de NH_4^+ .

A viabilidade celular (Figura 5.8b) manteve-se superior a 90% durante praticamente todo o cultivo celular, decrescendo apenas no final do cultivo, quando condições limitantes ou inibitórias do crescimento já eram evidentes.

As tabelas 5.4 e 5.5 resumem os principais resultados obtidos nestes ensaios e indica que a melhor condição de crescimento, tanto do ponto de vista da maximização de $\mu_{X,MAX}$, quanto da produção celular ($\Delta_{X,MAX}$), foi alcançada com o Meio 4. A tabela 5.8 mostra os dados da produtividade máxima alcançada em cada ensaio.

Ensaio	Meio	$\Pi_{X,MAX}$ (cel/mL.h)	$\mu_{X,M\acute{A}X}(h^{-1})$
10	1a	1,08E+04	0,0248
11	9	1,56E+04	0,0192
13	ба	1,83E+04	0,0217
12	1	1,51E+04	0,0183
15	+	3,69E+04	0,0231

 Tabela 5.8 - Produtividades máximas alcançadas nos cultivos em meios com SFB e isentos de SFB com a linhagem rHeLa e suas subpopulações.

Como até este momento do estudo, não haviam sido implementados nenhum método de quantificação de rFVIII no IPT, o critério para dar prosseguimento ao projeto foi a escolha dos meios que apresentaram maior produtividade celular e melhor velocidade específica máxima de crescimento, sendo eles, um isento de componente animal (Meio 4) e o outro quimicamente definido (Meio 6a).

5.1.1.3 Estudos com meio de cultivo isento de SFB em frascos Spinner

5.1.1.3.1 Influência da concentração inicial de células (Meio 6a)

Em seguida, estudou-se a influência da concentração inicial de células sobre a cinética de crescimento. A figura 5.9 mostra a comparação de duas cinéticas de crescimento com o Meio 6a (HyCD_a). A diferença entre essas cinéticas está na quantidade de células que foram inoculadas. Uma foi inoculada com $2,0x10^5$ cel/mL e a outra com concentração inicial mais baixa ($1,3x10^5$ cel/mL) (Ensaios 13 e 14, respectivamente, Tabela 4.3).

Na cinética com o inóculo mais baixo, o crescimento celular foi 3 vezes menor do que na cinética com o inóculo mais alto (Figura 5.9a, Tabelas 5.4 e 5.5). As viabilidades celulares se mantiveram acima de 90% durante toda a fase exponencial de crescimento.

A diferença entre os consumos de GLC entre as duas cinéticas em estudo é pequena (Figura 5.9c), mas o que se observa é que a eficiência da conversão de GLC à formação de biomassa ($Y_{X/GLC}$) é 2,3 vezes maior no Ensaio 13 (Tabelas 5.4 e 5.5). Outro aspecto importante é o fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$), que é cerca de 1,5 vez maior no Ensaio 14 (Tabelas 5.4 e 5.5). Como pode ser comprovado na figura 5.9d, a concentração de LAC é 1,5 vez maior na condição com o inóculo mais baixo, a qual apresenta em torno de 3 g/L de lactato no instante em que o crescimento exponencial é interrompido. Esta concentração é considerada alta e pode ter exercido um efeito de inibição ao crescimento.

Não está claro porque o Ensaio 14 teve uma produção de LAC tão superior e uma velocidade específica máxima de crescimento de cerca de 1,4 vezes menor que o Ensaio 13 (Tabelas 5.4 e 5.5). Ozturk e Palsson (1990) observaram que em cultivos de hibridoma em frasco T, a produção de LAC aumentava concomitantemente com o aumento da concentração celular inicial e, também que diferentes concentrações iniciais de células não alteravam a velocidade específica máxima de crescimento.



A partir deste estudo, a concentração inicial de células foi fixada em $2,0x10^5$ cel/mL.

Figura 5.9 - Resultados alisados através do método *spline*, das cinéticas de crescimento da linhagem rHelaHyCDSp, com diferentes concentrações iniciais de célula (2,0x10⁵ cel/mL e 1,3x10⁵ cel/mL, Ensaios 13 e 14, Tabela 4.3, respectivamente), com o Meio 6a, em *Spinner*. (a) Concentração celular; (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; e (f) pH. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento nos Ensaios 13 (vermelha contínua) e 14 (azul contínua). (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).
5.1.1.3.2 Influência do volume de meio no crescimento celular em meios isentos de SFB (Meios 4 e 6a)

Ao longo dos subcultivos observaram-se comportamentos irregulares no crescimento celular, que pareciam estar associados ao volume de meio de cultivo utilizado nos experimentos. Assim, foram realizados cinco ensaios com dois meios de cultura isentos de SFB, em *Spinner*.

Os Ensaios 15 e 22 (Tabela 4.4) foram realizados com diferentes volumes de Meio 4 (140 e 250 mL, respectivamente), cujos resultados estão mostrados na figura 5.10.

O aumento do volume de meio de cultivo nos frascos resultou em uma redução significativa da produção máxima de células, aproximadamente de 65% (Figura 5.10a, Tabelas 5.4 e 5.5) e ocasionou alterações no metabolismo. O consumo de GLC foi semelhante em ambas às condições estudadas (Figura 5.10c, Tabelas 5.4 e 5.5). No entanto, a produção de LAC aumentou para o ensaio com maior volume (Figura 5.10d, Tabelas 5.4 e 5.5), de forma que se obteve um $Y_{LAC/GLC}$ 83% maior. Esse desvio de GLC para uma via fermentativa que leva à formação de maiores quantidades de LAC pode ser uma indicação de carência de oxigênio. Se por um lado, a condição com menor volume de meio apresenta a melhor condição de transferência de oxigênio, por outro está sujeita a efeitos cisalhantes mais severos. No entanto, os resultados sugerem que a diferença entre as transferências de oxigênio cause efeitos mais relevantes ao crescimento do que a diferença entre os efeitos de cisalhamento.

A mesma hipótese relativa à transferência de oxigênio pode responder pelas diferenças observadas na produção de NH_4^+ (Figura 5.10e), onde a condição com maior volume de meio apresentou um $Y_{NH4/X}$ quase 4,5 vezes maior. De qualquer forma, para elucidar esses comportamentos serão necessários ensaios em condições de oxigênio dissolvido constante (ou pelo menos conhecido), o que só será possível em biorreator.



Figura 5.10 - Resultados alisados através do método *spline* do estudo da influência do volume de meio inicial sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 15 e 22 (140 e 250 mL, respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento nos Ensaios 15 (vermelha contínua) e 22 (azul contínua). (a) Concentração celular; (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; e (f) pH. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

Com o Meio 6a, foram realizados três experimentos (Ensaios 23, 26 e 27, Tabela 4.3) com diferentes volumes de meio de cultura (140, 120 e 250 mL, respectivamente), cujos resultados estão apresentados na figura 5.11.

Como pode ser observado, o crescimento celular da condição com 140 mL foi apenas 10% (Tabelas 5.4 e 5.5) maior do que na condição com 120 mL, mas quando comparados com a condição de maior volume, a diferença foi de cerca de 40%, provando novamente



(Figuras 5.10 e 5.11, Tabelas 5.4 e 5.5) que o aumento do volume de meio causa diminuição do crescimento celular bastante significativa (Figura 5.11a).

Figura 5.11 - Resultados alisados através do método *spline* do estudo da influência do volume de meio inicial sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 23, 26 e 27 (140, 120 e 250 mL, respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento nos Ensaios 23 e 26 (azul contínua) e 27 (vermelha contínua). (a) Concentração celular; (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; e (f) pH. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

O fator de conversão de glicose a células $Y_{X/GLC}$ foi 35% maior no ensaio com maior crescimento (Ensaio 23), quando comparado com o ensaio de menor crescimento (Ensaio 27). O fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) foi semelhante nas três situações

estudadas, com valor médio de 0,564 g/g (CV=12%). No entanto, o menor fator de $Y_{NH4/X}$ foi obtido para condição de 140 mL, apresentando valores de 23% e 43% menores que as condições com 120 e 250 ml respectivamente (Tabelas 5.4 e 5.5).

A partir destes estudos, o volume de meio em frascos *Spinner* foi fixado em 140 mL para que houvesse maior comparabilidade entre os ensaios.

5.1.1.3.3 Influência da osmolalidade inicial nos meios de cultura com ou isentos de SFB

As tabelas 5.4 e 5.5 apresentam os resultados de crescimento e metabolismo da linhagem rHeLa e suas subpopulações rHeLaSiACFSp e rHeLaHyCDSp nos Meios 1a (Ensaios 7 e 8, Tabela 4.1), 4 (Ensaios 15 a 21, Tabela 4.3) e 6a (Ensaios 28 a 31, Tabela 4.3), respectivamente, para diferentes condições de osmolalidade inicial. O APÊNDICE A mostra as figuras isoladas de cada ensaio.

Os valores de osmolalidade se mantiveram praticamente constantes, durante todos os cultivos estudados, a não ser nos ensaios com osmolalidade inicial mais baixa, com o Meio 4 (Ensaios 15 e 16, Tabela 4.3). Pode-se observar uma tendência de redução dos valores desta variável ao final da fase exponencial de crescimento. A figura 5.12 mostra as variações de osmolalidade em quatro experimentos do conjunto de ensaios com o Meio 4.



Figura 5.12 - Variação de osmolalidade durante os cultivos com a linhagem rHeLaSiACFSp, para diferentes osmolalidades iniciais, com o Meio 4, em Spinner. Condições estudadas: 319 mOsm/kg (Ensaio 15), 333 mOsm/kg (Ensaio 16), 392 mOsm/kg (Ensaio 20) e 427 mOsm/kg (Ensaio 21). As linhas verticais indicam final da fase exponencial de crescimento no Ensaio 21 (linha contínua) e nos outros experimentos (linha tracejada).

O meio de cultura para células animais apresenta duas categorias principais de componentes: os nutrientes consumíveis pelas células e outros componentes "inconsumíveis", que são principalmente, os componentes inorgânicos, os quais equilibram a osmolaridade, tamponam o pH e corrigem equilíbrios iônicos (GAMBHIR et al., 1999).

De maneira geral, os nutrientes orgânicos consumíveis como: açúcares, aminoácidos e vitaminas, têm uma menor contribuição para a osmolalidade inicial do meio de cultura em comparação com as espécies inorgânicas. No entanto, o consumo destes nutrientes orgânicos foi provavelmente a causa da pequena redução de osmolalidade na figura 5.12, embora, como apontado por Gambhir et al. (1999), essa diminuição na osmolalidade pode ser parcialmente compensada pelos metabólitos produzidos durante o cultivo (por exemplo, lactato e amônia). O mesmo comportamento não foi evidente para valores mais elevados de osmolalidade inicial (392 mOsm/kg e 427 mOsm/ kg), que mostraram valores constantes de osmolalidades durante todo o cultivo. Como conclusão geral, estas alterações não devem interferir na análise da osmolalidade aqui apresentada, uma vez que as variações foram inferiores a 10%, além do fato de que estas alterações só ocorreram no final da fase exponencial de crescimento, assim não representam interferências significativas nos cálculos da tabela 5.5.

Deve-se ressaltar também, que os resultados obtidos neste conjunto de ensaios tem uma confiabilidade maior do que nos ensaios anteriores, nos quais estudou-se a influência do volume ou do pH, pois a osmolalidade, diferentemente destas outras variáveis, se manteve constante durante o tempo todo do cultivo.

O efeito da osmolalidade é mais facilmente avaliado na figura 5.13, onde os parâmetros da tabela 5.5 foram normalizados em relação ao valor máximo de cada variável cinética, para cada condição de meio de cultura estudado.

As figuras 5.13a e 5.13b demonstram que a hiperosmolalidade tem efeito deletério sobre o crescimento, independente do meio de cultura utilizado, ainda que existam diferenças em termos da intensidade deste efeito. A redução na velocidade específica de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) variou de 32% no Meio 1a (DMEM10%_a) entre 350 e 450 mOsm/kg, até 68% nos meios isentos de soro (Si-ACF e HyCD_a) entre 320 e 440 mOsm/kg, definindo valores críticos de osmolalidade de 390 mOsm/kg para o Meio 1a, 360 mOsm/kg para o Meio 4 e 320 mOsm/kg para o Meio 6a.

Comportamento semelhante pode ser observado para a variável produção celular máxima (ΔX), no meio com SFB, no qual os valores críticos de osmolalidade estão acima de 360 mOsm/kg, com uma redução de 43% no valor de ΔX ao se aumentar a osmolalidade de

360 para 450 mOsm/kg. Enquanto que, para os meios isentos de SFB, a redução nos valores de ΔX são de 68% para o Meio 6a e 93% para o Meio 4 ao se aumentar a osmolalidade de 320 para 440 mOsm/kg. Estes resultados demonstram que a presença de soro protege as células dos efeitos negativos da hiperosmolalidade. Nota-se, ainda, que a resposta é distinta para os meios sem soro. A hiperosmolalidade afeta mais as células no Meio 4, que é um meio livre de componentes animais do que no Meio 6a, que é um meio quimicamente definido.



Figura 5.13 - Efeito da osmolalidade sobre grandezas cinéticas normalizadas em relação aos seus valores máximos em meios com SFB (Meio 1a) e isentos de SFB (Meios 4 e 6a). (a) Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$); (b) Variação de concentração celular (ΔX), (c) Fator de conversão de glicose em células ($Y_{X/GLC}$), (d) Fator de formação de amônia por unidade de célula ($Y_{NH4/X}$), e (e) fator de conversão de glicose em lactato ($Y_{LAC/GLC}$) obtidos em meio de cultura com diferentes valores de osmolalidade.

A faixa de osmolalidade observada neste estudo é maior do que a faixa, normalmente, atribuída para células de mamíferos (270 a 330 mOsm/kg) (ZHU et al., 2005). No entanto, a literatura também destaca o fato de que as respostas são, usualmente, dependentes do tipo de células utilizadas (SCHMELZER et al., 2000), o que explicaria o comportamento diferente da rHeLa, em relação a outras linhagens de células animais. Células CHO são menos suscetíveis a efeitos de inibição do crescimento do que células de hibridomas, em uma mesma faixa de osmolalidade (DE ZENGOTITA et al., 1998; KIMURA; MILLER, 1996; OZTURK; PALSSON, 1991b; SCHMELZER et al., 2000). Células de insetos também apresentam uma maior tolerância a osmolalidade (OLEJNIK et al., 2003).

Além disso, os danos causados pela hiperosmolalidade variam bastante nos dados disponíveis na literatura. Reduções de cerca de 20 a 30% no crescimento foram observados em cultivos com células CHO, hibridomas e BHK em decorrência do aumento da osmolalidade causado pela produção de lactato na faixa de 0 a 5,4 g/L (CRUZ et al., 2000), enquanto que reduções de cerca de 40% foram observadas entre 290 e 435 mOsm/kg, em cultivos com hibridomas (OZTURK; PALSSON, 1991b). Zhu et al. (2005) observaram uma redução na velocidade específica de crescimento de hibridomas de cerca de 60% em 450 mOsm/kg de osmolalidade inicial.

Elevada osmolalidade também foi associada com o aumento da apoptose em cultura de hibridoma, sendo este o principal responsável pela morte celular (DE ZENGOTITA et al., 2002). Outros estudos conduzidos por Schmelzer e Miller (2002) e deZengotita et al. (2002) encontraram uma inibição de crescimento similar em meios de cultura com e isentos de SFB, isto é, um comportamento diferente observado neste quadro de ensaios.

Aparentemente, a redução do crescimento celular causada pela hiperosmolalidade está relacionada às alterações no metabolismo celular. A figura 5.13d mostra que o aumento da osmolalidade inicial de 347 para 450 mOsm/kg resultou, em aproximadamente, 33% de aumento do fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) para o Meio 1a. Para os Meios 4 e 6a isentos de SFB, o aumento foi de 2,34 e 3,42 vezes, respectivamente. Este comportamento pode ter dois efeitos sobre o crescimento celular: a) redução da disponibilidade de glicose para o crescimento celular ou b) ocasionar inibição devido ao excedente de lactato gerado, visto que esta é substância normalmente tóxica para células de mamífero. Os dados de $Y_{LAC/GLC}$ foram calculados durante a fase exponencial de crescimento e neste intervalo do cultivo houve sempre um excedente de glicose (GLC ~ 1,0 g/L).

Ainda na fase exponencial, observaram-se valores de consumo de glicose (Δ GLC) aproximadamente constantes para cada meio de cultivo, ainda que diferentes entre si. Isso indica que o aumento nos valores de Y_{LAC/GLC} decorreu de um maior acúmulo de lactato. Portanto, há fortes indícios de que o efeito inibitório do lactato seja o responsável pela redução nos valores de $\mu_{X,MAX}$ (Figura 5.13a) e Δ X (Figura 5.13b). Neste caso, a figura 5.13d também indica que, provavelmente, o efeito sobre Y_{LAC/GLC} foi independente da formulação dos meios ou da adição de soro.

Em particular, para as condições $Osm_0 < 377 \text{ mOsm/kg}$, no Meio 4 (Si-ACF) e $Osm_0 = 360 \text{ mOsm/kg}$, no Meio 1a (DMEM10%_a), que apresentaram esgotamento de glicose ao final do crescimento, pode ter ocorrido também uma limitação do crescimento por esgotamento desta fonte de carbono.

Visto que com o aumento da osmolalidade, reduziu-se o consumo de glicose (Δ GLC) na fase exponencial para meios isentos de soro e se manteve praticamente constante para o meio com soro, pode-se afirmar que as reduções nos valores de Y_{X/GLC} (Figura 5.13c) devem-se à redução nos valores de formação de células (Δ X). Isso explica a semelhança entre os perfis observados nas figuras 5.13c e 5.13b.

As análises de glutamina foram feitas para os ensaios do quadro com Meio 6a. Pode-se observar que o perfil de $Y_{X/GLN}$ (Figura 5.13f) tem um comportamento semelhante ao de $Y_{X/GLC}$ (Figura 5.13c). No entanto, o consumo deste aminoácido (Δ GLN) foi muito parecido nos quatro ensaios, o que pode ser um indício de que o metabolismo de glutamina é efetivamente alterado com o aumento da osmolalidade.

Nos estudos de deZengotita et al. (1998) e de deZengotita et al. (2002), somente o aumento da osmolalidade não afetou significativamente a via glicolítica e, consequentemente, as velocidade específicas de consumo de glicose (μ_{GLC}) e de produção de lactato (μ_{LAC}). Oejnik et al. (2003), no entanto, reportam aumentos de até 37% nos valores de μ_{GLC} e μ_{LAC} . Ozturk e Palsson (1991b) observaram um efeito ainda mais expressivo, com aumentos de 130% nestes valores, quando comparados com condições de referência.

O lactato é o único metabólito que contribui significativamente com a osmolalidade (GAMBHIR et al., 1999), de forma que os efeitos negativos observados com o acúmulo deste subproduto nos cultivos são, ao menos em parte, devido a este incremento na osmolalidade (CRUZ et al., 2000). Como não se observam mudanças significativas na osmolalidade durante as fases exponenciais de crescimento, o efeito inibitório da formação de altas concentrações de lactato foi atribuído principalmente a alterações no pH do meio de cultura.

Entretanto, as grandezas cinéticas relacionadas ao crescimento celular (Figuras 5.13a e 5.13b), possivelmente também sofreram influência da alteração observada no metabolismo de síntese de amônia. A hiperosmolalidade resultou em um aumento de 51, 67 e 79% na formação de NH_4^+ (Figura 5.13e), para os Meios 1a, 4 e 6a, respectivamente. Diferente do que foi observado anteriormente para a influência da Osm_0 sobre a síntese de LAC (Figura 5.13d), o efeito sobre o metabolismo de síntese de NH_4^+ foi menor para os meios isentos de SFB (Meios 4 e 6a), pelo menos para os valores de $Osm_0 < 380-400$ mOsm/kg. No entanto, análogo ao que foi comentado para o metabolismo de lactato, também se espera que a maior formação de amônio implique em maior inibição do crescimento.

Portanto, como já havia sido mencionada a similaridade entre o crescimento (Figura 5.13b) e o perfil de formação de subproduto (Figura 5.13c) também se aplica a esta análise, mesmo que os valores de $Y_{\rm NH4/X}$ tenham sido um pouco mais elevados, o soro demonstrou, mais uma vez, um efeito protetor a hiperosmolalidade, com uma resposta menos deletéria sobre o $Y_{\rm NH4/X}$.

O aumento da atividade metabólica em condição hiperosmótica também é corroborada por uma absorção mais elevada de aminoácidos para compensar a condição adversa externa (TAKAGI et al., 2001). A velocidade específica de consumo de glutamina (μ_{GLN}) aumentou significativamente em Ozturk e Palsson (1991b) (até 120%), mas foi menos expressiva em deZengotita et al, (2002). Como esperado, Ozturk e Palsson (1991b) observaram um aumento de magnitude semelhante (140%) na velocidade específica de produção de amônio, mas o fator de conversão de glutamina a amônio não foi afetado. deZengotita et al. (2002), por outro lado, observaram uma diminuição de 43% no fator de conversão de glutamina a amônio.

5.1.1.3.4 Resultados de produção de rFVIII com a linhagem rHeLa

Os pesquisadores do Hemocentro de Ribeirão Preto haviam selecionado esta linhagem (rHeLa) por apresentar altos níveis de produção de rFVIII, cerca de 5 a 7 vezes superiores ao nível de FVIII presente no plasma sanguíneo. O valor normal definido para uma pessoa sadia é de 1 UI/mL de FVIII, que equivale a 100% de atividade da proteína, segundo recomendações da *World Health Organization International Standard for Plasma Factor VIII* (BRASIL, 2005).

Neste momento do projeto, foi implementado no laboratório do IPT, o método de quantificação de rFVIII por Tempo da Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa, ver item

4.7.13), que permitiu a avaliação da produção da proteína em cada um dos meios de cultura estudados.

A tabela 5.9 mostra os resultados de produção da proteína rFVIII, com a linhagem rHeLa e as suas subpopulações nos Meios 1a, 4, 6a e 9.

IIIeLa, nos N	10105 1a, 4	, 0a e 9.	
Linhagem	Sistema	Meio	Concentração de rFVIII (UI/mL)
rHeLa	T-25	1a	2,00
rHeLa	Spinner	1a	0,38
rHeLaSiACFSp	Spinner	4	0,04
rHeLaHyCDSp	Spinner	ба	0,76

 Tabela 5.9 - Concentração de rFVIII em diferentes condições de cultivo com a linhagem rHeLa, nos Meios 1a, 4, 6a e 9.

O melhor resultado obtido no teste de coagulação em meio de cultura isento de SFB foi com o Meio 6a (HyCD_a). A partir desses testes, este meio foi selecionado para dar prosseguimento aos estudos de ampliação de escala e iniciou-se então, os estudos de suplementação do meio, visando a maximização da produção de rFVIII, e os ensaios em biorreator. Nestes ensaios, foram obtidos valores de até 5 UI/mL no teste TTPa. Esta linhagem sintetizava alguma substância desconhecida capaz de promover a coagulação neste teste. Estes resultados elevados e promissores fizeram com que houvesse uma grande demora na identificação da perda de expressão da linhagem.

5.1.1.3.5 Influência da adição de Pluronic F68 ao Meio 6a

A adição do biosurfactante protetor ao meio de cultivo pode reduzir significativamente os danos celulares causados por cisalhamento. O pluronic F68 atua modificando as propriedades de escoamento do fluido e as interações com a membrana celular. Assim, este biosurfactante cria um mecanismo de proteção resultante da diminuição da turbulência provocada pela agitação, pois para um mesmo valor de tensão cisalhante, os fluxos laminares causam menos danos às células que os fluxos turbulentos.

Foram estudadas três condições em *Spinner*, uma considerada como referência, pois não teve nenhuma adição do biosurfactante, as outras duas tiveram adições de 0,1 e 0,2% (p/v) (Ensaios 23 a 25, respectivamente, Tabela 4.3). A figura 5.14 apresenta os resultados deste estudo.

Nas três condições analisadas, não se observa diferença significativa em relação à produção celular (Figura 5.14a), sendo que a diferença entre o maior e o menor valor obtido foi inferior a 10% (Tabelas 5.4 e 5.5).

As adições de pluronic F68 provocaram alterações no metabolismo celular. O ensaio com 0,1% (p/v) do biossurfactante apresentou um $Y_{X/GLC}$ em média 35% maior que as outras duas condições (Tabela 5.5). Esta condição também apresentou menor formação de NH₄⁺, com um $Y_{NH4/X}$ 29% menor do que nas outras condições testadas (Figura 5.14e e Tabelas 5.4 e 5.5).



Figura 5.14 - Resultados alisados através do método *spline* do estudo da adição de pluronic F68 sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 23 a 25 (sem adição de pluronic, com 0,1% (p/v) de adição e com 0,2% (p/v) de adição, respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. A linha vertical (preta contínua) indica o instante do fim da fase exponencial de crescimento dos todos os ensaios. (a) Concentração celular; (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; e (f) pH. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

O aumento na concentração de pluronic F68 provocou um aumento na produção de LAC, de forma que os valores de $Y_{LAC/GLC}$ aumentaram em 70%, quando a concentração passou de 0 para 0,2% (p/v) do biossurfactante (Figura 5.14d e Tabela 5.5).

Como o crescimento celular não sofreu influência significativa da adição do protetor, concluímos que o cisalhamento do sistema ao qual a célula é submetida não compromete o crescimento celular, de forma que se optou por não se adicionar o pluronic F68 ao meio de cultura nos ensaios subsequentes. Esta condição também tem a vantagem de minimizar a produção de LAC, cujo acúmulo pode inibir o crescimento celular.

5.1.1.3.6 Influência da adição de aminoácidos ao Meio 6a

Dos 17 aminoácidos presentes nos meios de cultura (Tabela 5.7), a glutamina, a serina e a cistina se destacam por sua importância no metabolismo celular. A glutamina (GLN), além de fonte de energia, é um importante bloco estrutural para o metabolismo celular, sendo requerida como fonte de nitrogênio na síntese de pirimidinas e purinas, açúcares aminados, NAD e asparagina (ver item 3.4). A cistina (CYS), por sua vez, é formada por duas cisteínas, com papel importante na conformação de proteínas e em sua atividade biológica, unindo as cadeias peptídicas através de pontes dissulfeto (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008). A serina (SER) participa do processamento de proteínas, através da glicosilação de suas ramificações, sendo essencial para o enovelamento correto da proteína e na proteção da biomolécula de degradação por proteases (JENTOFT, 1990).

A escolha dos aminoácidos a serem avaliados neste estudo foi feita a partir dos resultados de ensaios ditos "referência" (Ensaios 13, 23 e 28, Tabela 4.3), isto é, cinéticas de crescimento de células rHeLaHyCDSp cultivadas em frasco *Spinner*, nas quais não houve suplementação do meio de cultivo (Meio 6a). Como não foi possível analisar os aminoácidos de todos estes ensaios, devido ao custo das análises, verificou-se se havia uma reprodutibilidade entre as grandezas cinéticas e os valores das variáveis principais, no final do crescimento exponencial dos mesmos (Tabelas 5.4 e 5.5). A tabela 5.10 mostra a média, o DP e o CV dos valores das variáveis de estado e das grandezas cinéticas calculadas nestes ensaios.

Tabela 5.10 - Valores das médias, DP e CV das variáveis de estado e das grandezas cinéticas na fase exponencial de crescimento dos ensaios referências (Ensaios 13, 23 e 28, Tabelas 4.3, 5.4 e 5.5) com a linhagem rHeLaHyCDSp, em *Spinner*. (As Figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

Variáveis	Média	DP	CV (%)
$t_{EXP}(h)$	89,6	11,2	12,5
X (cel/mL)	1,58E+06	3,78E+05	23,9
ΔX (cel/mL)	1,39E+06	3,55E+05	25,5
pH	6,90	0,05	0,7
GLC (g/L)	3,18	0,16	5,1
$NH_4^+(mg/L)$	57,85	8,62	14,9
LAC (g/L)	2,01	0,38	19,1
$Y_{X/GLC}$ (cel/g)	2,81E+08	1,31E+07	4,7
$Y_{LAC/GLC}$ (g/g)	0,557	0,060	10,8
Y _{LAC/X} (g/cel)	2,1E-09	2,31E-10	11,2
Y _{NH4/X}	3,95E-02	7,02E-03	17,8
$\mu_{X,MAX} (h^{-1})$	0,02443	0,002	9,9

Pode-se observar que a maior parte dos coeficientes de variação se encontra abaixo de 20%. As únicas variáveis com maior CV são: concentração celular (X) e variação de concentração celular (Δ X). No entanto, estes valores se encontram abaixo de 25,5%. Esta variabilidade é considerada aceitável, considerando os erros das metodologias analíticas envolvidas. Desta forma, pode-se utilizar apenas um destes ensaios (no caso, o escolhido foi o Ensaio 28, Tabela 4.3) para a realização de todas as análises de aminoácidos, as quais seriam representativas de todo o conjunto de ensaios referência.

A figura 5.15 mostra o resultado típico de um ensaio referência (Ensaio 28, Tabela 4.3). As células atingem concentração celular de $1,84 \times 10^6$ cel/mL em aproximadamente 145 horas e apresentam um crescimento exponencial até 77 horas (instante marcado pela linha vertical na Figura 5.15a). Glicose e glutamina são as principais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. O lactato, o amônio e a alanina (não mostrada) são os subprodutos resultantes do metabolismo destes nutrientes.

É possível observar que há disponibilidade de glicose durante todo o cultivo, de forma que não se suspeita de limitação por este substrato. Os aminoácidos serina, glutamina e cistina, por sua vez, apresentam concentrações muito baixas no final da exponencial e se esgotam em instantes próximos à interrupção do crescimento (Figuras 5.15d, 5.15e e 5.15f, respectivamente). As concentrações (mg/L) de cada um dos aminoácidos presentes no Meio

6a, estão apresentados na tabela 5.11. Pode-se observar, que todos os outros aminoácidos, com exceção do glutamato, prolina, glicina e alanina, são consumidos e não atingem concentrações consideradas limitantes.

Ao final da fase de crescimento exponencial, observa-se que a concentração de lactato atingiu aproximadamente 4 g/L (Figura 5.15c) e pode ter exercido efeitos inibitórios ao crescimento celular. A concentração de amônio de 65 mg/L (Figura 5.15e), por outro lado, não parece inibir o crescimento celular.



Figura 5.15 - Resultados alisados, através do método *spline* de um ensaio típico de referência (Ensaio 28, Tabelas 4.3, 5.4 e 5.5) com a linhagem rHeLaHyCD, com Meio 6a. As linhas verticais indicam final da fase exponencial de crescimento (azul contínua) e final do crescimento e início da morte celular (preta tracejada). (a) Concentração celular (Xv) e viabilidade celular (Viab); (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de serina; (e) Concentrações de glutamina e amônio; e (f) Concentração de cistina.

	Con	centração (mg	g/L)	Consumo/Produção percentual (%)				
Aminoácidos	Início	t _{EXP}	t _{FIM}	t _{EXP}	t _{FIM}			
Arginina	151,17	143,78	0,00	4,89	100,00			
Alanina	47,38	60,92	63,10	28,58	33,18			
Asparagina	76,22	76,22	64,74	0,00	15,06			
Cistina	78,67	9,68	1,57	87,70	98,00			
Fenilalanina	75,29	53,19	37,35	29,35	50,39			
Glicina	52,63	67,61	68,69	28,46	30,51			
Glutamato	143,98	305,35	310,48	12,08	15,64			
Glutamina	687,45	77,03	3,91	88,79	99,43			
Histidina	15,65	13,90	12,03	11,18	23,13			
Isoleucina	206,14	176,62	135,28	14,32	34,37			
Leucina	190,40	135,40	93,35	28,89	50,97			
Lisina	1357,43	1050,25	813,86	22,63	40,04			
Metionina	76,40	53,13	36,11	30,46	52,74			
Prolina	259,75	273,59	273,56	5,33	5,32			
Serina	188,64	48,28	0,00	74,41	100,00			
Tirosina	134,28	99,25	72,48	26,09	46,02			
Treonina	119,83	93,85	0,00	21,68	100,00			
Triptofano	23,83	15,18	6,40	36,30	73,14			
Valina	101,96	70,86	48,30	30,50	52,63			

Tabela 5.11 - Concentração, consumo (em preto) e produção (em vermelho) de aminoácidos
em instantes críticos do cultivo: final do crescimento exponencial (t_{EXP}) e final
de crescimento celular (t_{FIM}) do Ensaio 28 (Tabela 4.3).

A partir desta análise, inicialmente, foi feito um estudo apenas com adição de glutamina, que, além de ser uma fonte de energia direta para a célula, também é diretamente responsável pela formação de amônio, um potencial inibidor do crescimento celular. As condições dos 5 ensaios (Ensaios 32 a 36, Tabela 4.3) realizados foram: ensaio referência, sem adição de GLN (Ensaio 32); com adições de 25% e 50% de GLN no instante inicial (Ensaios 33 e 34, respectivamente); com adições de 25% e 50% de GLN no fim da fase exponencial de crescimento (Ensaios 35 e 36, respectivamente). As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A.

Os valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) não foram afetados pela suplementação de GLN (média = 0,0239 h⁻¹ e CV = 3,6%), assim como a extensão da fase exponencial (t_{EXP}) (média = 94 e CV = 0%), independente da suplementação de nutrientes ter sido feita no início do cultivo ou no fim da fase exponencial. Pode-se observar que nos ensaios nos quais a GLN foi adicionada no início do ensaio (Ensaios 33 e 34) a produção de células (ΔX) diminuiu em até 15%, quando comparada ao ensaio de

referência (Ensaio 32) (Tabelas 5.4 e 5.5). O $Y_{NH4/X}$ não foi afetado, apresentando valor médio de 3,36x10⁻² mg/10⁶cel (CV = 10,4%) (Tabela 5.5), isto não era esperado, uma vez que o aumento na disponibilidade de glutamina deveria resultar em um aumento na produção de amônio.

O contrário aconteceu com a formação de lactato. O valor de $Y_{LAC/GLC}$ foi cerca de 21% maior no Ensaio 33, e 6% maior no Ensaio 34, quando comparados ao ensaio de referência (Ensaio 32) (Tabela 5.5). Esse aumento na síntese de lactato não afetou $\mu_{X,MAX}$ ou a extensão da fase exponencial, no entanto, houve um menor crescimento (ΔX até 15% menor) nessas condições, caracterizando uma situação de inibição.

O aumento na formação de lactato (Tabela 5.4) para condições de suplementação de GLN justifica-se pela interdependência dos metabolismos dos dois principais nutrientes em cultivos de células animais, glicose e glutamina, um fenômeno amplamente descrito na literatura (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008). O que é inusitado neste caso, é que o efeito do aumento da disponibilidade de glutamina não tenha determinado um incremento significativo na síntese de NH₄⁺.

Nos ensaios onde a GLN foi adicionada no fim da fase exponencial (Ensaios 35 e 36), todos os valores de fatores de conversão encontram-se na mesma faixa daqueles da referência (Tabelas 5.5 e 5.7). O ΔX_{MAX} aumentou em até 33%, quando comparado com a referência. Esse resultado indica que o sistema estava efetivamente limitado em glutamina, no entanto, a suplementação não afetou a fase exponencial ($\mu_{X,MAX}$ ou t_{EXP}). O crescimento adicional se deu após o final dessa etapa do crescimento. A conclusão é que existe outro fator limitante ou inibidor nessas condições, ainda não identificado. Deve-se ressaltar que estes ensaios não possuem controle de pH e oxigênio dissolvido, de forma que os resultados obtidos podem ter sido influenciado por estas variáveis.

Em seguida, foi feito um estudo com adição de glutamina, serina e cistina. As condições dos 5 ensaios (Ensaios 37 a 41, Tabela 4.3) realizados foram: ensaio referência, sem adição de GLN, SER ou CYS (Ensaio 37); com adições de 50% de GLN (Ensaio 38); 50% de SER (Ensaio 39); 50% de CYS (Ensaio 40) e 50% dos três aminoácidos (Ensaio 41) no meio da fase exponencial de crescimento (Ensaios 37 a 41, Tabela 4.4). As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A.

O metabolismo celular sofreu algumas alterações decorrentes da adição destes aminoácidos. As adições de glutamina e serina não afetaram significativamente a eficiência de conversão de glicose a biomassa ($Y_{X/GLC}$) e o $\mu_{X,MAX}$, com valores de CV em torno de 7,69 e

2,9%, respectivamente (Tabela 5.5). A cistina, por sua vez, causou uma diminuição de 13,3% no valor de $Y_{X/GLC}$, 37% da produção celular máxima e 7% de $\mu_{X,MAX}$, quando comparada ao ensaio de referência (Tabela 5.5). A adição dos três aminoácidos seguiu a tendência resultante da adição deste aminoácido, de tal forma que o $Y_{X/GLC}$ deste ensaio sofreu uma diminuição de 33% e o $\mu_{X,MAX}$ sofreu uma diminuição de 21% (Tabela 5.5). Em todos os casos, a adição de aminoácidos diminuiu a conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) em até 61%, o que sugere que o metabolismo de glicose e destes aminoácidos é interdependente (Tabela 5.5).

Para aprofundar as conclusões obtidas com adição de cistina foram realizados 3 experimentos (Ensaios 42, 43 e 44, Tabela 4.3), cujas condições foram: ensaio referência, sem adição de CYS (Ensaio 42); com adições de 50% a mais de CYS no instante inicial e em 48 horas após o início do ensaio (Ensaios 43 e 44, respectivamente). As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A.

Os ensaios com 50% a mais de cistina (Ensaios 43 e 44) apresentaram um aumento em média de 28% e 25% no crescimento celular, respectivamente, em relação ao Ensaio 42. Porém, o $\mu_{X,MAX}$ diminuiu cerca de 2% (Ensaio 43) e 6% (Ensaio 44), quando comparados à referência.

Os resultados de crescimento celular deste último conjunto de ensaios foram diferentes do ensaio anterior (Ensaio 40), no qual se observou uma diminuição de até 37% da produção celular em relação à referência. Esta variabilidade pode ter sido ocasionada, devido a grande dificuldade de diluição de cistina no meio de cultura, a qual requer uma diminuição drástica do pH para 2 durante o preparo do meio.

De modo geral, não foram observadas melhorias expressivas com a adição de nenhum dos três aminoácidos estudados, o que mostra que apesar das concentrações destes aminoácidos chegarem próximas de zero no fim da fase exponencial do ensaio referência (Ensaio 28, Tabela 4.3) não há evidências que estes aminoácidos limitam o crescimento celular, de forma que optou-se por não alterar as concentrações iniciais dos mesmos nos ensaios posteriores.

5.1.1.3.7 Influência da adição de suplementos ao Meio 6a

Nos Ensaios 45 a 48 (Tabela 4.3), avaliou-se o efeito no crescimento e metabolismo da linhagem rHeLaHyCDSp com a adição de albumina, uma proteína presente no soro fetal bovino e que é responsável pelo transporte de lipídeos e sais, e com a adição de aprotinina,



um inibidor de proteases, ao Meio 6a (Figura 5.16). A tabela 5.5 mostra as principais grandezas cinéticas obtidas destes ensaios.

Figura 5.16 - Resultados alisados através do método *spline* do estudo da adição de suplementos sobre a cinética de crescimento dos Ensaios 45 a 47 (sem adição de suplementos, com 1g/L de albumina, com 1g/L de aprotinina e com 1g/L de albumina e aprotinina de adição, respectivamente, Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento nos Ensaios 45 e 47 (preta contínua), 46 (vermelha tracejada) e 47 (preta tracejada). (a) Concentração celular; (b) Concentração de glicose; (c) Concentração de amônio; (d) Concentração de lactato. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

Em todos os ensaios o fim da fase exponencial de crescimento acontece quando a concentração de lactato chega a aproximadamente 2,5 g/L, o que sugere que este subproduto pode ter exercido um efeito inibidor ao crescimento celular (Figura 5.16d).

Quando comparados à condição de referência, a adição de albumina (Ensaio 46) resultou em valores 14 e 105 % menores de $\mu_{X,MAX}$ e ΔX_{MAX} , respectivamente (Tabela 5.5). Por outro lado, a adição de aprotinina (Ensaio 47) resultou no aumento dos valores de $\mu_{X,MAX}$ e ΔX_{MAX} em 5 e 11 %, respectivamente. No Ensaio 48, onde ambos os suplementos foram adicionados, o valor de $\mu_{X,MAX}$ pouco se alterou, mas o crescimento celular, de forma semelhante ao Ensaio 46, apresentou uma diminuição de 2,3 vezes (Tabela 5.5).

Observa-se que todos os valores de $Y_{LAC/GLC}$ são praticamente iguais (média = 0,646 g/g e CV = 5,9%) (Tabela 5.5).

Os fatores de conversão de glicose a biomassa ($Y_{X/GLC}$, Tabela 5.5) obtidos nos ensaios sem adição de albumina são aproximadamente o dobro daqueles obtidos nos ensaios nos quais se adicionou albumina. Da mesma maneira, os valores obtidos para $Y_{NH4/X}$ nos ensaios com adição de albumina foram 2,14 vezes maiores que os outros sem adição.

Este resultado sugere que a adição de albumina tem um efeito deletério e altera o metabolismo celular, tornando o metabolismo da glicose menos eficiente, de forma a produzir menos biomassa e mais lactato por glicose consumida.

De modo geral, não foram observadas melhorias expressivas com a adição destes suplementos, de forma que optou-se por não adicioná-los nos ensaios posteriores.

5.1.2 Estudos cinéticos em biorreator operado em modo batelada

5.1.2.1 Controle da qualidade do inóculo

A avaliação da qualidade dos inóculos ganha importância quando se utilizam células animais, um sistema reconhecidamente mais complexo e sensível, quando comparado aos microrganismos e, portanto, mais susceptível a variabilidades metabólicas "inexplicáveis" e de difícil controle.

Assim, sempre que se iniciava um ensaio em biorreator, utilizava-se parte das células do inóculo para iniciar um ensaio em *Spinner*, o qual era denominado ensaio controle. O objetivo destes ensaios era avaliar a condição fisiológica das células utilizadas no inóculo em biorreator, de forma a eliminar a possibilidade de obtenção de conclusões erradas devido à inoculação de células com menor potencial de crescimento. A figura 5.17 mostra os resultados destes ensaios.

Pode-se observar que os resultados obtidos neste conjunto de ensaios são muito semelhantes. O valor médio para $\mu_{X,MAX}$ foi de 0,023 h⁻¹ e o CV obtido foi extremamente baixo, de 3,54 %. Portanto, pode-se considerar validada a utilização destes inóculos nos ensaios em biorreator, de forma que todos os resultados e conclusões obtidas podem ser diretamente relacionadas às condições estudadas.



OBiF8_15 + BiF8_17 ■ BiF8_18 ● BiF8_19

Figura 5.17 - Conjunto de ensaios controle em *Spinner*, para os Ensaios 51 a 59 (BiF8_10, BiF8_11, BiF8_12, BiF8_13, BiF8_14, BiF8_15, BiF8_17, BiF8_18 e BiF8_19, respectivamente), realizados em biorreator.

5.1.2.2 <u>Avaliação da influência do oxigênio dissolvido (pO₂)</u>

A concentração de oxigênio dissolvido neste quadro de ensaios variou entre 5 e 50% (saturação em ar), enquanto que as concentrações de glicose (GLC) e glutamina (GLN) foram mantidas constantes. Este conjunto, que engloba os Ensaios 50 a 52 (Tabela 4.4), tem como finalidade avaliar se este substrato é limitante para o crescimento da linhagem rHeLaHyCDSp. Nestes ensaios, também foram medidos os principais subprodutos da célula, amônia e lactato (NH₄⁺ e LAC) para observar se o crescimento é inibido por alguma destas substâncias.

As figuras 5.18 a 5.22 mostram os resultados do Ensaio 50, considerado um ensaio típico referência.



Figura 5.18 - Resultados do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisados através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com 30% de oxigênio dissolvido. (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de glutamina; e (f) Concentração de NH4⁺. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento (azul contínua) e o fim do crescimento e início da morte celular (vermelha tracejada).

As tabelas 5.12 e 5.13 mostram os valores das variáveis de estado nos instantes críticos do processo (final da fase exponencial, fim do crescimento celular e início da morte celular) e os valores das grandezas cinéticas calculadas na fase exponencial de crescimento, respectivamente, para todos os ensaios realizados em biorreator com esta linhagem.



Figura 5.19 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Concentração de: (a) Alanina; (b) Arginina; (c) Asparagina; (d) Cistina; (e) Fenilalanina; e (f) Glutamato. A linha contínua azul representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.



Figura 5.20 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Concentração de: (a) Leucina; (b) Lisina; (c) Metionina; (d) Isoleucina; (e) Glicina; e (f) Histidina. A linha contínua azul representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.



Figura 5.21 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Concentração de: (a) Prolina; (b) Tirosina; (c) Serina; (d) Triptofano; (e) Treonina; e (f) Valina. A linha contínua azul representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.



Figura 5.22 - Variáveis de estado do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisadas através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Dados de (a) volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH; e (b) percentual de oxigênio dissolvido. A linha contínua vermelha representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.

Ao final da fase exponencial, não se observa a existência de uma fase estacionária ou de uma fase de desaceleração (Figura 5.18a), ou seja, a morte celular ocorre logo após a interrupção do crescimento. A viabilidade celular se mantém alta durante todo o período de crescimento exponencial. No entanto, no exato momento em que a exponencial é interrompida, observa-se uma diminuição abrupta nos valores de viabilidade celular (Figura 5.18a).

O final do crescimento exponencial ocorre no mesmo instante no qual há o esgotamento da glicose no meio de cultura (Figuras 5.18a e 5.18c). Além disso, a morte celular tem início imediatamente após o esgotamento da glicose, o que sugere que este substrato não apenas limita o crescimento exponencial, como também é responsável pela manutenção da viabilidade celular.

Infelizmente, devido ao custo da metodologia de análise de aminoácidos, foi necessário limitar a quantidade de amostras analisadas. No entanto, é possível identificar perfis de consumo de glutamina e cistina, os quais mostram que estes aminoácidos se esgotam no meio de cultura aproximadamente 30 horas antes da interrupção do crescimento exponencial (Figuras 5.18a e 5.19d), o que sugere que a glutamina e a cistina não são fatores limitantes do crescimento celular, por outro lado, a serina se esgota em um instante próximo ao final da fase exponencial, o que sugere que esse aminoácido pode exercer algum efeito limitante ao crescimento celular.

			Condições iniciais					Exponencial										
Ensaio	Nome no Laboratório	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	pO ₂ (%)	Osm (mOsm/kg)	X ₀ (cel/mL)	$t_{LAG}(h)$	$t_{EXP}(h)$	X (cel/mL)	∆X	pН	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	NH 4 (mg/L)	LAC (g/L)			
50 (REF)	BiF8_08			30		1,99E+05	20,5	117,0	3,63E+06	3,46E+06	7,33	0,84	0	51,65	3,39			
51	BiF8_10	8	700	5	270	1,95E+05	0,0	119,0	3,12E+06	2,92E+06	7,41	0,08	ND	58,60	4,39			
52	BiF8_11			50		2,13E+05	19,4	121,4	3,14E+06	2,94E+06	7,69	0,11	ND	56,78	2,94			
53 (REF)	BiF8_12		700 8 350	700	700	700			2,23E+05	20,5	123,0	3,05E+06	2,81E+06	7,41	0,27	ND	66,81	3,16
54	BiF8_13	8 350 1050		20	320	2,02E+05	0,0	126,0	2,73E+06	2,49E+06	7,42	2,29	ND	24,73	2,86			
55	BiF8_14		o 1050	1050	30	320	2,13E+05	0,0	92,1	1,92E+06	1,71E+06	7,39	0,31	ND	96,03	5,45		
56	BiF8_19		175			2,10E+05	0,0	28,5	4,10E+05	2,00E+05	7,45	6,83	ND	18,36	0,62			
57	BiF8_15	17	700			2,20E+05	0,0	123,3	4,01E+06	3,79E+06	7,45	8,35	ND	44,45	6,95			
58	BiF8_17	4	700	30	320	1,84E+05	21,2	93,0	1,45E+06	1,26E+06	7,37	0,00	ND	99,22	2,41			
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	19,3	73,7	4,77E+05	2,76E+05	7,40	0,01	ND	58,3	1,13			

Tabela 5.12 - Valores das variáveis de estado dos ensaios, nos instantes críticos do processo (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível).

		Condições iniciais						Fim do crescimento						
Ensaio	Nome no Laboratório	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	pO ₂ (%)	Osm (mOsm/kg)	X ₀ (cel/mL)	$t_{FIM}(h)$	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	NH 4 (mg/L)	LAC (g/L)
50 (REF)	BiF8_08			30		1,99E+05	123,0	3,73E+06	3,56E+06	7,40	0,58	0	51,69	3,47
51	BiF8_10	8	700	5	270	1,95E+05	119,0	2,84E+06	2,63E+06	7,41	0,08	ND	58,60	4,39
52	BiF8_11			50		2,13E+05	121,4	3,14E+06	2,94E+06	7,69	0,11	ND	56,78	2,94
53 (REF)	BiF8_12		700	20		2,23E+05	123,0	3,05E+06	2,81E+06	7,41	0,27	ND	66,81	3,16
54	BiF8_13	0	350		220	2,02E+05	142,08	2,92E+06	2,72E+06	7,33	1,19	ND	22,68	3,47
55	BiF8_14	0	1050	50	320	2,13E+05	98,88	1,98E+06	1,77E+06	7,41	0,15	ND	98,35	5,59
56	BiF8_19		175			2,10E+05	94,17	8,30E+05	6,20E+05	7,40	5,65	ND	21,69	1,35
57	BiF8_15	17	700			2,20E+05	129,0	4,00E+06	3,76E+06	7,45	7,83	ND	44,22	7,45
58	BiF8_17	4	700	30	320	1,84E+05	93,0	1,45E+06	1,26E+06	7,37	0,00	ND	99,22	2,41
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	90,0	5,38E+05	3,37E+05	7,40	0,00	ND	71,96	0,81

	37	Condições iniciais						Morte						
Ensaio	Nome no Laboratório	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	pO ₂ (%)	Osm (mOsm/kg)	X ₀ (cel/mL)	t _{MORTE} (h)	X (cel/mL)	ΔX (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	NH 4 (mg/L)	LAC (g/L)
50 (REF)	BiF8_08			30		1,99E+05	123,0	3,73E+06	3,56E+06	7,40	0,58	0	51,69	3,47
51	BiF8_10	8	700	5	270	1,95E+05	119,0	2,84E+06	2,63E+06	7,41	0,08	ND	58,60	4,39
52	BiF8_11			50		2,13E+05	121,4	3,14E+06	2,94E+06	7,69	0,11	ND	56,78	2,94
53 (REF)	BiF8_12		700		320	2,23E+05	123,0	3,05E+06	2,81E+06	7,41	0,27	ND	66,81	3,16
54	BiF8_13	0	350	20		2,02E+05	147,0	2,79E+06	2,59E+06	7,42	0,84	ND	23,62	3,60
55	BiF8_14	0	1050	50		2,13E+05	98,88	1,98E+06	1,77E+06	7,41	0,15	ND	98,35	5,59
56	BiF8_19		175			2,10E+05	-	-	-	-	-	ND	-	-
57	BiF8_15	17	700			2,20E+05	129,0	4,00E+06	3,76E+06	7,45	7,83	ND	44,22	7,45
58	BiF8_17	4	700	30	320	1,84E+05	93,0	1,45E+06	1,26E+06	7,37	0,00	ND	99,22	2,41
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	90,0	5,38E+05	3,37E+05	7,40	0,00	ND	71,96	0,81

Nomeno				Condições In	niciais					V		YNHAN	
Ensaio	Nome no Laboratório	GIC(q/I)	GLN	nO (9/)	Osm	Χ _θ	$Y_{X/GLC}$ (cel/g)	$Y_{LAC/GLC} (g/g)$	$Y_{X/GLN}$ (cel/g)	I NH4/GLN	$Y_{LAC/X} (g/cel)$	$(mg/10^{6} cel)$	$\mu_{XMAX}(h^{-1})$
	Laboratorio	OLC (g/L)	(<i>mg/L</i>)	$pO_2(70)$	(mOsm/kg)	(cel/mL)				(g/g)			
50 (REF) BiF8_08			30		1,99E+05	4,23E+08	0,446	2,11E+06	1,51E+01	1,07E-09	4,00E-02	0,0282
51	BiF8_10	8	700	5	270	1,95E+05	2,63E+08	0,513	ND	ND	2,02E-09	3,82E-02	0,0233
52	BiF8_11			50		2,13E+05	3,34E+08	0,404	ND	ND	1,26E-09	3,75E-02	0,0238
53 (REF) BiF8_12		700		320	2,23E+05	3,34E+08	0,437	ND	ND	1,29E-09	6,20E-02	0,0232
54	BiF8_13	0	350	20		2,02E+05	4,41E+08	0,569	ND	ND	1,48E-09	5,00E-02	0,0205
55	BiF8_14	0	1050	50		2,13E+05	1,84E+08	0,804	ND	ND	4,36E-09	7,01E-02	0,0250
56	BiF8_19		175			2,10E+05	3,52E+08	1,017	ND	ND	2,70E-09	3,59E-02	0,0242
57	BiF8_15	17	700			2,20E+05	3,23E+08	0,715	ND	ND	2,21E-09	3,62E-02	0,0242
58	BiF8_17	4	700	30	320	1,84E+05	1,86E+08	0,723	ND	ND	3,56E-09	6,69E-02	0,0246
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	8,71E+07	0,538	ND	ND	3,64E-09	1,49E-01	0,0159

 Tabela 5.13 - Valores das grandezas cinéticas dos ensaios, calculadas na fase de crescimento exponencial.

Este resultado difere daqueles observados por Reitzer et al. (1979, 1980) que mostraram que a maior parte da energia produzida por células HeLa é proveniente da glutamina e que esta linhagem apresenta baixas atividades das enzimas da via glicolítica, principalmente quando comparadas às atividades das enzimas da via das pentoses, o que indica que, em células HeLa, a glicose é utilizada principalmente para a produção de precursores para a biossíntese. Uma possível explicação para diferenças metabólicas tão intensas é o fato de que estes estudos foram realizados em frascos T, utilizando meio MEM (*Minimum Essential Medium*), o qual é caracterizado por apresentar baixas concentrações dos substratos principais, suplementado com soro fetal bovino. Esta condição é completamente diferente da estudada neste trabalho (ensaios em biorreator, com meio livre de soro e altas concentrações iniciais dos substratos principais) o que pode ter sido a causa de resultados tão diferentes.

Uma possível explicação para o esgotamento da glutamina não afetar o crescimento exponencial é o fato de que o glutamato começa a ser consumido quando a concentração de glutamina é de aproximadamente 145 mg/L (Figuras 5.18e e 5.19f) e este consumo só é interrompido no instante em que há o esgotamento de glicose (Figuras 5.18c e 5.19f). Isto pode ser um indício de que, apesar da glutamina ser o aminoácido preferencial, esta linhagem é capaz de substituí-la pelo glutamato sem afetar o fluxo de α -cetoglutarato no ciclo de Krebs e, consequentemente, mantendo a produção de ATP constante até o esgotamento da glicose (ver Figura 3.10).

No entanto, é possível observar que o esgotamento da glutamina provoca uma leve queda na viabilidade celular, o que sugere que este aminoácido também atua na manutenção da viabilidade celular, junto com a glicose (100 horas, Figuras 5.18a, 5.18c e 5.18e).

A literatura mostra que a influência da disponibilidade destes substratos no crescimento celular é diretamente dependente da linhagem celular utilizada. Sun e Zhang (2004) mostraram que o crescimento de células CHO está diretamente ligado à disponibilidade de glicose, enquanto que a glutamina pouco afeta este crescimento. Cultivos de hibridoma, por outro lado, dependem da disponibilidade de ambos os substratos para o crescimento celular. No entanto, a viabilidade celular depende somente da disponibilidade de glutamina (HÄGGSTRÖM et al., 1996).

Lactato e amônio são subprodutos do metabolismo de glicose e de glutamina, respectivamente (Figuras 5.18c, 5.18d, 5.18e e 5.18f). Observa-se o reconsumo de LAC após o esgotamento da GLC (Figuras 5.18c e 5.18d), indicando que o lactato produzido é convertido de volta a piruvato, e pode realimentar o TCA (ver Figura 3.9). Este fenômeno já

foi observado para células de mamíferos anteriormente (ALTAMIRANO et al., 2004; OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992; TSAO et al., 2005). A concentração máxima de lactato atingida (3,46 g/L, Figura 5.18d) é considerada alta e há uma boa chance dessa concentração já ser inibitória ao crescimento (OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992).

A produção de NH_4^+ está diretamente relacionada ao consumo de glutamina. Isto fica evidente no momento em que ocorre o esgotamento de glutamina, ocorre a interrupção na produção de amônio (90 horas, Figuras 5.18e e 5.18f). Esse padrão típico de produção de NH_4^+ será utilizado para inferir a disponibilidade de GLN no meio de cultivo, quando a análise de aminoácidos não estiver disponível.

As concentrações de amônio atingidas nos ensaios estão entre 50 e 60 mg/L, valores considerados altos e que também podem exercer efeitos inibitórios ao crescimento celular (Figuras 5.18a e 5.18f). Hassell et al. (1991) já documentaram que células HeLa cultivadas em frasco T possuem baixa tolerância ao amônio e sofrem efeitos adversos ao crescimento, quando a concentração deste subproduto chega a 13,6 mg/L. Neste trabalho não se observou que a intolerância fosse tão baixa, uma vez que o crescimento celular não foi perturbado, quando a concentração de amônio atingiu este nível, no entanto deve-se considerar que estes ensaios foram realizados em uma condição muito mais controlada de oxigênio e, principalmente, de pH, que é a principal variável afetada pela a produção de amônio.

A síntese de alanina é um recurso metabólico que células animais dispõem como forma de drenar subprodutos tóxicos do interior das células, através da via da alanina aminotransferase (AlaTA, Figura 3.10), piruvato e glutamato são convertidos em alanina, diminuindo a produção de lactato e amônio (AMABLE; BUTLER, 2008; DOVERSKOG et al., 1997). Neste ensaio, há certamente excesso de glicose, no entanto, a glutamina se esgota rapidamente. Assim, enquanto há glutamina disponível no meio de cultura, o metabolismo celular é direcionado para a produção de alanina e, assim que a glutamina é totalmente consumida, o piruvato produzido na via glicolítica deixa de ser consumido pela via da alanina aminotransferase, sendo, então, direcionado para a produção de lactato (Figuras 5.18d, 5.18e e 5.19a).

É importante ressaltar que, apesar de se ter observado que esta linhagem consegue utilizar o glutamato presente no meio de cultura para o crescimento, após o esgotamento da glutamina, não há indícios de que o glutamato também seja utilizado para a produção de alanina, uma vez que o instante em que há esgotamento de glutamina coincide com o instante de aumento de velocidade de produção de lactato, evidenciado pelo aumento da inclinação da curva de produção deste subproduto (Figuras 5.18d, 5.18e e 5.19f).

O pH foi controlado entre 7,2 e 7,5 (Figura 5.18b), durante todo o período do ensaio, exceto nas últimas horas, quando se observou um aumento neste valor, provavelmente devido à formação de NH_4^+ , advinda do consumo de glutamato na segunda metade do ensaio.

O controle do pH foi feito pela adição de base (NaHCO₃) e ácido (HCl). A base é adicionada desde o início dos ensaios com o objetivo de controlar o pH em decorrência da produção de ácido láctico (Figura 5.20a). É possível observar uma correlação entre a adição de base e a produção de lactato nas primeiras 90 horas do ensaio (Figuras 5.18d e 5.22a). No entanto, após este período, há uma adição de apenas 5% de base, enquanto que foi produzido mais 35% de lactato. Desta forma, deve-se levantar a hipótese de que alguma via, provavelmente ligada ao metabolismo de aminoácidos, produz algum subproduto capaz de compensar a queda de pH causada pela produção de lactato, de forma que o pH se mantém estável sem que haja a necessidade de adicionar mais base.

As figuras 5.23 e 5.24 mostram os resultados obtidos no conjunto de ensaios para estudo do efeito do oxigênio dissolvido (Ensaios 50 a 52, Tabela 4.4), a figura 5.25 mostra os resultados das principais grandezas cinéticas obtidas e as tabelas 5.12 e 5.13 mostram os valores das variáveis de estado nos instantes críticos do processo e os valores das grandezas cinéticas calculadas na fase exponencial de crescimento, respectivamente, para todos os ensaios realizados.

Todos os ensaios foram adequadamente controlados para os valores de oxigênio dissolvido designados, ou seja, não houve flutuação significativa neste valores para além dos *set-points* estabelecidos (Figuras 5.22b, 5.24b e 5.24d), de forma que todos os efeitos observados podem ser diretamente relacionados às mudanças neste parâmetro. Para o Ensaio 50 foi obtida uma média deste parâmetro de 29,73% (CV = 19,47%), para o Ensaio 51, a média foi de 5,03% (CV = 1,93%) e para o Ensaio 52 a média foi de 50,07% (CV = 5,17%).

O Ensaio 52 foi o único a apresentar fase lag com duração de 19,4 horas (Tabela 5.12). Não há indícios de que esta fase lag esteja relacionada com a condição estudada e também não parece ser devido a concentrações iniciais baixas (X₀) no biorreator, uma vez que todos os ensaios foram iniciados com valores equivalentes de X₀, sendo que este não apresentou variações significativas entre os ensaios (Média = $2,06x10^5$ cel/mL, CV = 5,82%, Tabela 5.12). Assim, supõe-se que a ocorrência desta fase está relacionada à necessidade de um período de adaptação provavelmente devido à transferência de um ambiente sem controle de variáveis importantes, como o pH e o pO₂ (frasco *Spinner*), para um ambiente completamente controlado (biorreator).

Observa-se que, em todos os ensaios, o esgotamento da glicose causa o final da fase exponencial e o início da morte celular (Figuras 5.23a, 5.23b e 5.23c), o que reforça a hipótese de que este substrato é o responsável pelo crescimento e pela manutenção da viabilidade celular.

As análises de glutamina só estão disponíveis para o Ensaio 50. No entanto, para os Ensaios 51 e 52 (com 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente), é possível inferir, a partir do perfil de produção de NH_4^+ , identificando o instante no qual a produção deste subproduto é interrompida ou severamente reduzida, que o esgotamento de glutamina também ocorre aproximadamente 24 e 31 horas, respectivamente, antes do final da fase exponencial destes cultivos (Figuras 5.23a e 5.23f). Desta forma, a glutamina não parece limitar o crescimento celular neste conjunto de ensaios.

As concentrações máximas de lactato são atingidas nos instantes em que termina a fase exponencial e no qual ocorre o esgotamento da glicose. No Ensaio 51 obtém-se uma concentração máxima de 4,5 g/L, que é considerada alta e pode ter exercido efeito inibitório ao crescimento celular (AMABLE; BUTLER, 2008; OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992). Também é possível observar que a produção de lactato é inversamente proporcional à disponibilidade de oxigênio, ou seja, a maior concentração de lactato foi obtida no ensaio com menor concentração de oxigênio dissolvido (Ensaio 51, Figura 5.23d). Este resultado era esperado pois, a menor disponibilidade de oxigênio favorece as vias fermentativas, cujo produto final é o próprio lactato.

Diferentemente do lactato, a produção de amônio não apresenta diferenças significativas entre os ensaios de forma que no final da fase exponencial, estes ensaios apresentaram em média 55,22 mg/L de amônio (CV = 5,38%), o que sugere que a via metabólica de consumo de glutamina não é alterada de acordo com a disponibilidade de oxigênio. Como já foi mencionado, as concentrações de amônio ao final da fase exponencial estão entre 50 e 60 mg/L e são consideradas altas, podendo exercer efeito de inibição ao crescimento celular.

Em todos os ensaios deste conjunto, como já havia sido mencionado para o Ensaio 50, a quantidade de base utilizada para o controle de pH não se correlaciona com a quantidade de lactato produzido, como era esperado. Em todos os ensaios, a adição de base é severamente reduzida por volta de 100 h. Após este instante, o volume adicionado aumenta em 5%, 4% e 2,3% para os Ensaios 50, 51 e 52 (30 %, 5 % e 50 % de pO₂), respectivamente (Figuras 5.22a,

5.24a e 5.24c). O lactato produzido, por sua vez, tem um acréscimo de 35%, 20% e 61% nos Ensaios 50, 51 e 52, respectivamente (Figura 5.23d). Apesar disso, os valores de pH mantêmse controlados (Figura 5.23e). Não está claro qual é o efeito capaz de manter o pH estável apesar da produção de lactato, sem que haja a necessidade de adição de base, mas é evidente que há uma alteração metabólica neste momento, de forma que algum subproduto de teor básico passa a ser produzido.



Figura 5.23 - Resultados alisados através do método *spline* dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. (a) Crescimento celular (Xv); (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) pH; e (f) Concentração de NH4⁺. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial dos Ensaios 50 (linha contínua azul), 51 (linha contínua vermelha) e 52 (linha tracejada preta). (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).



Figura 5.24 - Variáveis de estado dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. Volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH nos ensaios (a) 51; e (c) 52; e percentual de oxigênio dissolvido nos ensaios (b) 51; e (d) 52. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial.

O crescimento celular obtido na condição com pO₂ a 30% da saturação foi igualmente superior àqueles observados para 5% e 50% em cerca de 20% (Tabelas 5.12 e 5.13; Figura 5.25a). Da mesma forma, o valor de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) foi cerca de 21% e 18% superior aos Ensaios 51 e 52, respectivamente (Figura 5.25a, Tabela 5.13). Assim, no que se refere ao crescimento celular, esta condição se mostra superior às outras estudadas.

Em cultivos com células animais, a concentração de oxigênio que mais favorece o crescimento é muito específica para cada linhagem utilizada, de forma que é muito difícil estabelecer uma tendência. Em estudos com células BHK, Augusto et al. (2000) identificaram a condição de 10% de oxigênio dissolvido como ótima para a produção celular. Miller et al. (1987) identificaram o valor de 0,5% como o pO₂ ótimo para o crescimento de uma linhagem de hibridoma, enquanto que Mizrahi (1984) verificou que a condição de 50% era a que maximizava o crescimento de células de linfoblastos humanos.

Link et al. (2004) não observaram diferenças significativas no crescimento celular de uma linhagem de células CHO cultivadas em condições de p O_2 entre 40 e 60%. No entanto,

quando se reduziu a concentração de oxigênio para 5%, observou-se uma redução no crescimento de quase 80%.

Em alguns casos, uma mesma linhagem cultivada em meios diferentes pode necessitar concentrações de oxigênio dissolvido diferentes para maximizar o crescimento. Em cultivos de células de inseto *Drosophila melanogaster*, Batista et al. (2009) identificaram a condição de 40% pO₂ como a ideal para o crescimento em meio RPMi, enquanto que Aguiar (2010) verificou que a condição de 5% era a melhor em cultivo em meio TC100.



Figura 5.25 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente, para avaliação do efeito do pO₂. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. (a) Velocidade específica máxima de crescimento $(\mu_{X,MAX})$ e crescimento celular (ΔX); (b) Fator de conversão de glicose a células (Y_{X/GLC}); (c) Fator de produção de amônio por células (Y_{NH4/X}); e (d) Fator de conversão de glicose a lactato (Y_{LAC/GLC}).

Pode-se observar que na condição com 30% de oxigênio dissolvido também há o melhor aproveitamento de glicose para a produção de células ($Y_{X/GLC}$), cujo valor obtido é 28% e 61% maior que nos ensaios de 50% e 5%, respectivamente (Tabela 5.13; Figura 5.25b). Os valores do fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) diminuem conforme se aumenta a disponibilidade de oxigênio no sistema (Figura 5.25d), o que é esperado, uma vez que a maior disponibilidade de oxigênio deve aumentar o fluxo de piruvato no TCA, e

diminuir a fermentação no metabolismo celular, a qual resulta na formação de lactato (Figuras 3.9 e 3.10).

Por outro lado, o aumento da concentração de oxigênio no sistema não parece exercer influência significativa na formação de NH_4^+ (Figura 5.25c, Tabela 5.13).

Estas mudanças no metabolismo de acordo com a concentração de oxigênio dissolvido são muito específicas para a linhagem celular estudada. Jan et al. (1997) mostraram que, em cultivos com hibridoma, o fator de conversão de glutamina a amônio ($Y_{NH4/GLN}$) não sofria alterações em condições entre 10 e 125% de oxigênio dissolvido. Nesta mesma faixa de operação, o fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) aumentou 20%.

5.1.2.3 Avaliação da influência da concentração inicial de glutamina (GLN₀)

Nestes ensaios, os valores de GLN_0 variaram entre 175 e 1050 mg/L, enquanto que as outras variáveis foram mantidas constantes. As figuras 5.26 e 5.27 mostram os resultados dos Ensaios 53 a 56 (Tabela 4.4) e a figura 5.28 mostra a comparação entre as grandezas cinéticas obtidas nestes ensaios. As tabelas 5.12 e 5.13 mostram os valores dos parâmetros e das variáveis nos instantes críticos do processo.

O ensaio referência para este conjunto de ensaios, a princípio, seria o número 50. No entanto, para que se pudesse adicionar uma concentração maior de glicose e glutamina e, assim, aumentar a faixa de estudo, decidiu avaliar-se o efeito de uma maior osmolalidade ao crescimento celular. Assim, o Ensaio 53 foi feito sob as mesmas condições que o 50, mas com osmolalidade de 320 mOsm/kg, enquanto que a do Ensaio 50 foi de 270 mOsm/kg. Desta forma, para se poder fazer uma comparação, todos os ensaios dos quadros de glicose e glutamina foram realizados com meios de cultura com osmolalidade de 320 mOsm/kg.

Nenhum ensaio deste conjunto de ensaios apresentou fase lag extensa no início do crescimento celular (Figura 5.26a), o que indica que as concentrações iniciais de substrato não são altas o suficiente para atingir uma situação de inibição. Não foram observadas fases estacionárias após a interrupção do crescimento (Figuras 5.26a). Em todos os ensaios, a viabilidade celular se manteve alta (maior que 90%) durante toda a fase de crescimento exponencial e, após a interrupção do crescimento celular, este valor apresentou uma queda abrupta (Figura 5.26b).



Figura 5.26 - Resultados alisados através do método *spline* dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com condições de GLN₀ de 700, 350, 1050 e 175 mg/L, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a ou 6b, em biorreator. (a) Crescimento celular (Xv); (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) pH; e (f) Concentração de amônio. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial nos Ensaios 53 (azul contínua), 54 (vermelha contínua), 55 (preta tracejada) e 56 (vermelha tracejada). (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).


Figura 5.27 - Variáveis de estado dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com condições de GLN₀ de 700, 350, 1050 e 175 mg/L, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a ou 6b, em biorreator. Volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH nos ensaios (a) 53; (c) 54; (e) 55; e (g) 56; e percentual de oxigênio dissolvido nos Ensaios (b) 53; (d) 54; (f) 55; e (h) 56. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento.



Figura 5.28 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com condições de GLN₀ de 700, 350, 1050 e 175 mg/L, respectivamente, para avaliação do efeito da concentração inicial de glutamina (GLN₀). Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a ou 6b, em biorreator. (a) Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) e Crescimento celular (ΔX); (b) Fator de conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$); (c) Fator de produção de amônio por células ($Y_{NH4/X}$); e (d) Fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$).

Mais uma vez, observa-se que nos Ensaios 53 e 55 (700 e 1050 mg/L de GLN_0 , respectivamente), a fase de crescimento exponencial é interrompida no instante em que há o esgotamento da glicose, o que reforça a hipótese de que este substrato limita o crescimento. Da mesma forma, o esgotamento da glicose faz com que a morte celular aumente rapidamente, mostrando que este substrato também é responsável pela manutenção da viabilidade celular (Figuras 5.26a e 5.26c).

A análise da exponencial do Ensaio 54 (350 mg/L de GLN_0) mostra que o valor de $\mu_{X,MAX}$ começa a diminuir quando ainda restam 2,3 g/L de glicose no meio (Figuras 5.26a e 5.26c). Isso indicaria uma condição de limitação caracterizada por um coeficiente de limitação (K_S) elevado, o que parece pouco provável, visto que os valores indicados na literatura para células animais estão em uma faixa de 0 a 0,2 g/L (AUGUSTO et al., 2008). Deve-se considerar a hipótese de que alguma outra limitação ou inibição foi responsável pela interrupção do crescimento nesta condição.

O Ensaio 56 (175 mg/L de GLN_0) também não apresenta relação entre o final do crescimento exponencial e o esgotamento de glicose (Figuras 5.26a e 5.26c). No entanto, este é um ensaio onde GLN_0 é muito baixa (175 mg/L), de forma que o crescimento celular pode ter sido limitado por esta condição.

Não foram feitas análises de aminoácidos para estes ensaios. No entanto, é possível identificar o instante aproximado no qual há o esgotamento de glutamina, por ser o instante no qual a formação de NH_4^+ é interrompida ou severamente reduzida (Figura 5.26f). Assim, observa-se que nos Ensaios 53, 54 e 56 (700, 350 e 175 mg/L de GLN₀, respectivamente) este aminoácido se esgota antes do instante no qual há a interrupção do crescimento exponencial (Figuras 5.26a e 5.26f), o que sugere mais uma vez que este aminoácido não está diretamente relacionado ao crescimento exponencial.

No Ensaio 55, com GLN_0 igual a 1050 mg/L, observa-se que o esgotamento da glutamina ocorre no mesmo instante em que há a interrupção do crescimento exponencial. O esgotamento de glicose ocorre no mesmo instante, de forma que há uma sobreposição de efeitos (Figuras 5.26a, 5.26c e 5.26f). Considerando as observações feitas nos outros ensaios, não se acredita que o esgotamento da glutamina tenha causado interrupção do crescimento exponencial deste ensaio.

Neste conjunto de ensaios, observa-se que a adição de base para controle do pH tem um perfil que pode ser correlacionado com a produção de lactato (Figuras 5.26d, 5.27a, 5.27c, 5.27e e 5.27g). Além disso, em todos os ensaios, a concentração inicial de glutamina, a quantidade de lactato produzido e, consequentemente, a quantidade de base consumida são diretamente proporcionais. Este comportamento metabólico provavelmente está relacionado com a produção de alanina. Como já foi dito anteriormente, enquanto há glutamina disponível no meio de cultura, o metabolismo celular é direcionado para a produção de alanina e, assim que a glutamina é totalmente consumida, o piruvato produzido na via glicolítica passa a ser direcionado para a produção de lactato.

Zagari et al. (2013) observaram comportamento semelhante em um clone de células CHO e associaram este comportamento a uma reduzida capacidade oxidativa da mitocôndria da linhagem celular. Uma hipótese para esta redução é que a regulação das enzimas e sistemas de transporte da mitocôndria está diretamente relacionada a componentes não conhecidos do meio de cultura.

Em particular, a concentração de lactato obtida no ensaio com 1050 mg/L de GLN_0 , de 5,45 g/L (Figura 5.26d, Tabela 5.12) pode ser considerada uma concentração inibitória ao

crescimento. Os valores atingidos nos outros ensaios são mais baixos de forma que não há indícios de inibição por lactato. Também se observa, nos Ensaios 53 e 55 (700 e 1050 mg/L de GLN_0 , respectivamente), o reconsumo de lactato após o esgotamento da glicose (Figuras 5.26c e 5.26d, Tabela 5.12).

Com relação às grandezas cinéticas, pode-se observar que a variação de glutamina não influencia significativamente a velocidade exponencial de crescimento celular (Tabela 5.13; Figura 5.28a). No entanto, as condições com 350 e 700 mg/L apresentam os maiores crescimentos celulares, com valor médio 57% maior que a segunda melhor condição, com 1050 mg/L (Figura 5.28a, Tabela 5.14).

A variação das condições iniciais de cultivo causam respostas diferentes de acordo com a linhagem celular estudada. Jeong e Wang (1995) estudaram o efeito da concentração inicial de glutamina em cultivos de hibridoma e obtiveram resultados distintos daqueles aqui obtidos. O crescimento celular (ΔX) aumentou ao se aumentar a concentração inicial de glutamina de 0 para 300 mg/L, mas manteve-se constante entre 300 e 875 mg/L. Os valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) mantiveram-se constantes entre 73 mg/L e 875 mg/L, mas apresentaram uma queda acentuada quando a concentração de glutamina foi reduzida de 73 para 0 mg/L.

Pode-se observar que a variação na concentração inicial de glutamina causou alterações no metabolismo celular. A produção de NH_4^+ segue um comportamento esperado, sendo maior conforme se aumenta a disponibilidade de glutamina (AMABLE; BUTLER, 2008). Assim, a condição com 1050 mg/L é a que apresenta maior produção de NH_4^+ por célula, cujo valor é 13% maior que a do ensaio com 700 mg/L, que é a condição com a segunda maior produção de NH_4^+ por célula (Figura 5.28c).

Além disso, também se observou variações nos valores do fator de conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$) e de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$), o que sugere que os metabolismos destes dois substratos são interdependentes.

A condição com 350 mg/L apresenta a maior eficiência na conversão de glicose a células, com $Y_{X/GLC}$, em média, 30% maior que dos ensaios com 175 e 700 mg/L, que são as segundas melhores condições (Tabela 5.13; Figura 5.28b). Apesar disso, a condição de 700 mg/L de GLN é a que produz menos lactato por glicose consumida, apresentando $Y_{LAC/GLC}$ 24% menor que o do ensaio com 350 mg/L (Tabela 5.13; Figura 5.28d). Isto pode ser explicado pelo fato da condição de 700 mg/L quando comparada às condições de 175 e 350 mg/L apresentar maior velocidade de consumo de glicose e igual velocidade de produção

de lactato. Estas velocidades podem ser inferidas através das inclinações das curvas de concentração de glicose e lactato nestes ensaios (Figura 5.26c e 5.26d). Este aumento de velocidade de consumo de glicose também é observado no ensaio com 1050 mg/L de GLN_0 . No entanto, observa-se um aumento na velocidade de produção de lactato, também, o que resulta em um aumento no valor de $Y_{LAC/GLC}$. Pode-se destacar que este aumento na velocidade de consumo de glicose provavelmente está relacionado com o esgotamento deste substrato nestes dois ensaios.

5.1.2.4 Avaliação da influência da concentração inicial de glicose (GLC₀)

A influência da concentração de glicose foi estudada avaliando a faixa entre 2 e 17g/L. As figuras 5.29 e 5.30 mostram os resultados dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4) e a Figura 5.31 mostra a comparação entre as grandezas cinéticas obtidas. As tabelas 5.12 e 5.13 mostram os valores das grandezas cinéticas e das variáveis nos instantes críticos do processo.

Neste conjunto de ensaios, observa-se mais uma vez, uma fase lag de aproximadamente 20 horas em todos os ensaios, indicando que a linhagem passa por um período de adaptação ao passar do frasco *Spinner* para o biorreator (Figura 5.29a). No entanto, estas fases de adaptação são muito curtas, de forma que não se acredita ter havido quaisquer efeitos de inibição por excesso de substrato nestes ensaios.

Mais uma vez, observa-se que não há uma fase estacionária após a interrupção do crescimento (Figuras 5.29a). A viabilidade celular se mantém alta (acima de 95 %) durante toda a fase de crescimento exponencial e, após a interrupção desta fase do crescimento, a viabilidade celular apresenta uma rápida queda, atingindo valores de até 20% (Figuras 5.29b).

Os Ensaios 58 e 59 (com GLC_0 igual a 4 e 2 g/L, respectivamente) mostram um comportamento semelhante aos ensaios anteriores, de forma que o final da fase exponencial ocorre no momento em que a glicose é completamente consumida, o que reforça a hipótese de que este substrato é diretamente responsável pelo crescimento celular (Figuras 5.29a e 5.29c). Da mesma forma, o esgotamento da glicose implica na queda da viabilidade celular, o que indica que a glicose também é o substrato responsável pela manutenção da viabilidade (Figuras 5.29b e 5.29c).



Figura 5.29 - Resultados alisados através do método spline dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com condições de GLC₀ de 8, 17, 4 e 2 g/L, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a ou 6b, em biorreator. (a) Crescimento celular (Xv); (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) pH; e (f) Concentração de amônio. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial nos ensaios 53 (azul contínua), 57 (vermelha contínua), 58 (preta tracejada) e 59 (vermelha tracejada). As linhas dos ensaios 53 e 57 estão sobrepostas. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE A).

O Ensaio 57 (17 g/L de GLC_0) mostra um comportamento diferente dos outros ensaios. Ao final da fase exponencial de crescimento, ainda restam aproximadamente 8,4 g/L de glicose, indicando que, neste caso em específico, este substrato não foi a responsável pela interrupção do crescimento exponencial (Figuras 5.29a e 5.29c). Por outro lado, ao final da fase exponencial, neste ensaio atinge-se a mais alta concentração de lactato de todos os ensaios realizados (7 g/L, Figura 5.29d, Tabela 5.12). Esta concentração é considerada alta, de forma que o final do crescimento exponencial e o início da morte celular podem ter ocorrido devido à inibição por excesso deste substrato. A concentração de lactato ao final da fase exponencial dos outros ensaios atinge uma concentração máxima de 2,0 g/L (Figura 5.29d) e não parece alta o suficiente para causar efeitos de inibição nestes cultivos. No entanto, para se obter uma confirmação desta hipótese, seria necessário realizar ensaios especificamente planejados para esta finalidade.

Mais uma vez, observou-se que quando a concentração de glicose começa a chegar próxima de zero, o lactato começa a ser reconsumido, indicando que este subproduto pode ser utilizado como fonte alternativa de carbono (Figura 5.29c e 5.29d).

Também é possível observar comportamentos distintos quanto à adição de base para controle de pH. No Ensaio 57, observa-se uma correlação entre a quantidade de base adicionada e o lactato produzido (Figuras 5.29d e 5.30a) até aproximadamente 100 horas, instante no qual observa-se uma redução na inclinação do perfil de adição de base, enquanto que não se observa redução semelhante na produção de lactato. Mais uma vez, acredita-se que houve uma mudança metabólica, na qual algum subproduto com teor básico começou a ser produzido, diminuindo a necessidade de adição de base.

O Ensaio 58 (4 g/L de GLC_0) mostra perfis de adição de base e de produção de lactato completamente correlacionáveis (Figuras 5.29d e 5.30c). Por outro lado, não é possível observar nenhuma correlação entre estas duas variáveis no Ensaio 59 (2 g/L de GLC_0). Uma explicação para isto é o fato da concentração de lactato produzida ser muito baixa neste ensaio, de forma que a adição de base pode ter ocorrido devido a outros fatores que, em condições com maiores concentrações de lactato são menos relevantes.

Analisando o perfil de formação de NH_4^+ , observa-se que só há esgotamento da glutamina nos Ensaios 57 e 58 (17 e 4 g/L de GLC₀, respectivamente) (Figura 5.29f). No entanto, o esgotamento deste aminoácido não parece estar relacionado com o final da fase exponencial em nenhum dos ensaios.

A produção de NH_4^+ é inversamente proporcional à concentração de glicose inicial nos ensaios (Figuras 5.29c e 5.29f), provavelmente devido à interdependência entre os metabolismos de glicose e glutamina. Ao aumentar a concentração de glicose de 2 para 17 g/L, causa-se, proporcionalmente, uma condição de limitação de glutamina. Esta condição resulta em um consumo mais eficiente deste aminoácido, produzindo menores concentrações de NH_4^+ nas condições com maior disponibilidade de glicose. Os Ensaios 58 e 59 (4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente) apresentam as maiores concentrações no instante de interrupção



da fase exponencial (98 e 60 mg/L, respectivamente, Figura 5.29f). Estas concentrações são consideradas altas e podem ter exercido efeito inibitório ao crescimento celular.

Figura 5.30 - Variáveis de estado dos ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), em biorreator, com condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente. Volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH nos ensaios (a) 57; (c) 58; e (e) 59; e percentual de oxigênio dissolvido nos ensaios (b) 57; (d) 58; e (f) 59. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial.



Figura 5.31 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com condições de GLC₀ de 8, 17, 4 e 2 g/L, respectivamente, para avaliação do efeito da concentração inicial de glicose. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meios 6a ou 6b, em biorreator. (a) Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) e crescimento celular (ΔX); (b) Fator de conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$); (c) Fator de produção de amônio por células ($Y_{NH4/X}$); e (d) Fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$).

Entre 4 e 17 g/L de GLC_0 , não foi observada variação significativa nos valores de $\mu_{X,MAX}$ (Tabela 5.13 e Figura 5.31a). Entretanto, a condição com 2 g/L de GLC_0 apresentou uma velocidade específica de crescimento aproximadamente 35% inferior à das outras condições, evidenciando que está é uma condição limitante ao crescimento celular. É possível observar uma correlação direta entre a disponibilidade de glicose e o crescimento celular. O maior valor de crescimento, obtido com 17 g/L de GLC_0 , foi 32% maior que o crescimento obtido na segunda melhor condição, com 8 g/L de GLC_0 (Figura 5.31a e Tabela 5.13).

Mais uma vez, foram observadas alterações no metabolismo, em decorrência da alteração da concentração inicial de substrato. A conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$) aumenta quase 4 vezes conforme se aumenta a disponibilidade de glicose de 2 para 8 g/L. Por outro lado, parece manter-se constante na faixa entre 8 e 17 g/L (Figura 5.31b e Tabela 5.13). A produção de lactato por glicose consumida ($Y_{LAC/GLC}$) também apresentou alterações. O aumento de GLC₀ de 8 para 17 g/L causa um aumento de 63% em $Y_{LAC/GLC}$, o que era esperado, uma vez que, em condições de maior disponibilidade de glicose, células animais

tendem a aumentar a velocidade de consumo deste substrato, diminuindo sua eficiência e produzindo mais lactato (ALTAMIRANO; GODIA; CAIRÓ, 2008). No entanto, o aumento de GLC_0 de 2 para 8 g/L mostrou um resultado inesperado: uma diminuição de aproximadamente 20% em Y_{LAC/GLC}, o que evidencia a condição de limitação à qual a linhagem é submetida na condição de 2 g/L de GLC_0 .

Cruz et al. (1999) também observaram que, em cultivos de células BHK, a variação da concentração inicial de glicose entre 0,6 mM e 30 mM (0,1 e 5,4 g/L, respectivamente) não alterou o valor do fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$). A adição de concentrações menores que 0,6 mM de glicose, no entanto, implicou em menores valores de $Y_{LAC/GLC}$. Isto pode ser uma indicação de que, caso este estudo englobasse concentrações iniciais ainda menores de glicose, esta redução nos valores de $Y_{LAC/GLC}$ seria observada.

O fator de conversão de amônio por células ($Y_{NH4/X}$) apresenta um perfil de maior produção de amônio quando a disponibilidade de glicose é menor (Figura 5.31c, Tabela 5.13). Como já foi mencionado, uma hipótese para este comportamento é a interdependência entre os metabolismos de glicose e glutamina, de forma que, proporcionalmente, concentrações iniciais elevadas de glicose causam uma condição de limitação de glutamina, resultando em baixa produção de amônio.

Uma outra abordagem sobre a influência das concentrações de O_2 , glicose e glutamina se encontram no APÊNDICE B.

5.2 Ensaios preliminares para determinação de variáveis de operação

Dadas as características de extrema labilidade da proteína de interesse (rFVIII), acredita-se que a melhor forma de produção deva ser o processo com alta densidade celular e alta velocidade de processamento, o qual só pode ser alcançado em um sistema operado em modo contínuo com reciclo de células (i.e., perfusão). Nesta etapa do trabalho, foram realizados ensaios preliminares para determinação de algumas variáveis de operação importantes para atingir este objetivo.

5.2.1 Estudos referentes à homogeneidade do sistema (Tempo de mistura)

O aumento de escala de bioprocessos depende da identificação de parâmetros representativos dos fenômenos de transferências de massa e de calor, homogeneidade e

cisalhamento do sistema. As condições de mistura estão intimamente ligadas à qualidade do produto (ENFORS et al., 2001; MICHELETTI et al., 2006). A escolha de um impelidor é crítica para a manutenção das condições hidrodinâmicas e de transferência de oxigênio apropriados.

Por um equívoco, o impelidor adquirido neste projeto foi especificado erroneamente. O impelidor que deveria ter sido adquirido era do tipo 2-*pitched-blade* já conhecido do grupo, porém foram adquiridas 2 peças do tipo 3-*blade segment*. No primeiro ensaio realizado com o novo impelidor, as células depositaram e aderiram ao vidro da dorna do biorreator.

Para solucionar este problema, iniciou-se um estudo do tempo de mistura. A idéia central foi reproduzir o tempo de mistura observado na configuração do Ensaio 49 (Tabela 4.4), onde foram utilizados 2 impelidores tipo 2-*pitched blade*, com uma agitação de 90 rpm.

Para complementar a análise de homogeneidade do sistema foi testado também, o impelidor tipo *Rushton*, disponível no laboratório. Mesmo sabendo que este impelidor possui um desempenho ruim do ponto de vista das tensões de cisalhamento, que podem ser transferidas às células e que estão diretamente relacionadas à integridade física das mesmas, e que seria o impelidor menos adequado a ser utilizado na produção da proteína recombinante de interesse, ele foi testado como uma possível opção de uso.

As variáveis selecionadas neste estudo são normalmente relevantes na questão de ampliação de escala do biorreator, sendo elas: agitação, tipo de impelidor, volume útil, número de impelidores e distância entre os mesmos.

Os resultados mais relevantes das influências destas variáveis no sistema estudado serão mostrados nos itens a seguir:

5.2.1.1 Influência da Agitação

Independente da configuração do biorreator ou do método de medida, incrementos na frequência de agitação resultam em diminuição do tempo de mistura (θ_M). As maiores variações ocorreram para:

- Impelidores 3-blade segment-45° e 3-blade segment-60° (Figuras 5.32a e 5.33);

- Agitação: 70-200 rpm (faixa de trabalho usual em cultivos celulares) (Figuras 5.32 a 5.36).

5.2.1.2 Influência da posição de adição do traçador

Quanto à influência da posição de adição do traçador (na superfície ou em profundidade), não houve um padrão único de resposta e, portanto, não foi possível correlacionar essas respostas com as variáveis estudadas. Existem condições onde θ_M é menor para adição em superfície (Figura 5.32a e 5.32b), outras onde θ_M é menor para adição em profundidade (Figuras 5.32b e 5.32c) e condições onde a posição de adição não é significativa (Figura 5.32d). Assim, tem-se indícios de que esta variável não atua de forma significativa no tempo de mistura.

5.2.1.3 Influência do tipo de impelidor

Os valores de θ_M são menores, logo melhores, pois a homogeneidade do sistema é atingida mais rapidamente, para impelidores tipo *Rushton* e 2-*pitched blade* (Figura 5.33). Na agitação de 200 rpm, estes impelidores apresentaram variação de θ_M de 10 e 40% menores, respectivamente, do que o θ_M com a agitação de 70 rpm.

Os impelidores 3-*blade segment*-60° e 3-*blade segment*-45° apresentaram θ_M de 2 a 3,5 vezes maiores que os demais. Ao aumentar a agitação de 70 para 200 rpm, o valor de θ_M decresce de 1,5 a 2,5 vezes, respectivamente.



Figura 5.32 - Influência da posição de adição do traçador sobre o Tempo de Mistura.



Figura 5.33 - Influência do tipo de impelidor sobre o Tempo de Mistura, volume de 1,5 L, adição do traçador em superfície.



Figura 5.34 - Influência do volume do biorreator sobre o Tempo de Mistura, com adição do traçador em superfície.



Figura 5.35 - Influência do número de impelidores sobre o Tempo de Mistura, Volume de 1,5 L, com adição do traçador em superfície.



Figura 5.36 - Influência da distância entre impelidores sobre o Tempo de Mistura.

5.2.1.4 Influência do volume útil

O aumento do volume de 1,5 L para 2,0 L teve um efeito mais expressivo sobre θ_M no caso do impelidor 3-*blade*-45°, apresentando uma diminuição de até três vezes (Figura 5.34a). Também foram avaliadas as condições com 1 e 2 impelidores 2-*pitched blade*. Em ambos os casos, os efeitos foram menos expressivos, com diminuições de 1,5 vez e de menos de 10% para os casos com um e dois impelidores, respectivamente (Figuras 5.34b e 5.34c).

No caso da *Rushton* (Figura 5.35a), o uso de dois impelidores geraram θ_M de 50 a 100% maiores, quando comparados com os resultados obtidos com um impelidor na faixa de 70 a 200 rpm. Com 2-*pitched blade* (Figura 5.35b), as diferenças entre os valores de θ_M não foram significativas.

5.2.1.6 Influência da distância entre os impelidores

Com o impelidor 3-*blade segment*-45° (Figura 5.36), observou-se um aumento em θ_M de 2,5 vezes, quando a distância entre os impelidores foi aumentada de 1D para 1,5D, com agitação até 90 rpm, acima deste valor de agitação as diferenças no θ_M não foram significativas.

5.2.1.7 <u>Comparação entre os θ_M dos impelidores 2-pitched blade e 3-blade segment</u>

A figura 5.37 mostra o θ_M almejado com a utilização de 2 impelidores 2-*pitched blade* (entre 5 e 6 segundos) e a faixa das velocidades de agitação necessárias para se atingir este θ_M com os impelidores 3-*blade segment*-45° e 3-*blade segment*-60° (Entre 120 e 210 rpm e entre 150 e 250 rpm, respectivamente).

Neste estudo, os volumes utilizados foram diferentes, 1,5 L para a condição com os 2 impelidores 2-*pitched blade* e 2L para os impelidores 3-*blade segment*. Optou-se por encontrar o θ_M em um volume maior com os impelidores 3-*blade segment*, visando estabelecer melhores condições para uma futura ampliação de escala.



Figura 5.37 - Influência da agitação no tempo de mistura com diferentes impelidores. (a) Impelidor tipo 2-pitched blade; (b) Impelidor tipo 3-blade segment-60° e (c) Impelidor tipo 3-blade segment-45°. Símbolos em azul indicam o tempo de mistura quando o álcali era adicionado em profundidade e símbolos em vermelho indicam o tempo de mistura quando o álcali era adicionado na superfície do líquido.

A partir dos resultados obtidos, foi selecionada a condição de 1 impelidor tipo *3-blade* segment-45° com agitação de 150 rpm (Figura 5.37c) para realização de uma cinética (Ensaio 50, Tabela 4.4). A figura 5.38 mostra a comparação das concentrações celulares entre essas duas cinéticas realizadas em biorreator, modo batelada. A primeira utilizando dois impelidores 2-pitched blade, que era a situação ideal de θ_M e a segunda, utilizando um impelidor 3-blade segment-45° (Ensaios 49 e 50, respectivamente). A linhagem utilizada foi a rHeLaHyCDSp e o meio de cultivo foi o Meio 6a.



Figura 5.38 - Cinéticas de crescimento em biorreator, com a linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, com os impelidores 2-*pitched blade* e 3-*blade segment*-45°.

Pode-se observar um crescimento celular 25% maior, quando foi utilizado o impelidor 3-blade segment-45°, concluindo-se que este impelidor gerou menores tensões de cisalhamento celular, um fator muito importante, quando se almeja atingir alta densidade celular. Outro fator importante é que este impelidor exige maiores frequências de agitação para promover igual θ_M . O que é muito interessante do ponto de vista de implementação do sistema operado em perfusão, com a utilização de sistema de retenção celular *spinfilter* interno, acoplado ao eixo de agitação do biorreator, pois frequências mais elevadas maximizam a retenção celular pelo *spinfilter*.

A partir deste estudo, o impelidor escolhido para todos os ensaios realizados em biorreator, foi o 3-*blade segment*-45°, cujas condições de número de impelidores e agitação foram 1 e 150 rpm, respectivamente.

5.2.2 Estudo da eficiência de retenção celular de um spinfilter externo

A operação de um processo em modo perfusão (contínuo com reciclo das células) tem como peça-chave o dispositivo de retenção celular utilizado. Estes dispositivos devem ser projetados, operados e escalonados de tal forma, que se maximize o tempo de operação dos mesmos, sem afetar negativamente a viabilidade celular. A longevidade da operação é uma

variável muito importante, uma vez que a produtividade volumétrica global de um processo de cultivo em perfusão aumenta com a duração do cultivo (FIGUEREDO-CARDERO, 2010).

Estudos de retenção de células animais exigem condições de assepsia, além da garantia de que a morfologia celular, assim como as concentrações celulares elevadas sejam mantidas em valores relativamente constantes durante todo o experimento. Estas condições demandam tempos elevados para preparação das células, além de ser bastante difícil assegurar alta viabilidade celular por tempos prolongados. Inevitavelmente, em algum momento do estudo, poderia ocorrer lise celular o que poderia resultar em obstrução do filtro (FIGUEREDO-CARDERO, 2010; VOISARD et al., 2003).

O primeiro dispositivo escolhido para o estudo de retenção celular foi o microfiltração tangencial Labscale (Millipore, EUA), porém não foi uma escolha adequada, visto que não foi possível manter a assepsia por um período de tempo superior a 48 horas.

O segundo dispositivo testado foi o *spinfilter* externo, um dispositivo mais interessante do ponto de vista de se conseguir uma maior longevidade do processo de produção, isto é, em um processo de produção operado em perfusão, onde exista mais de um *spinfilter* externo montado em paralelo, caso aconteça o entupimento do filtro, este pode se trocado sem que haja a interrupção da produção.

Nos testes com o *spinfilter* externo, foram estudadas 3 variáveis: i) a vazão específica de alimentação do sistema (2,5<D<8,53 d⁻¹); ii) a vazão de recirculação no *spinfilter* (50<Q_R<114mL/min) e; iii) a rotação do *spinfilter* no seu próprio eixo (65< ω <485 rpm). Para evitar problemas de assepsia e ainda separar os efeitos relativos à retenção e aqueles relativos ao entupimento da malha, propôs-se a substituição das células por partículas inertes de agarose (*Superose 6 prep grade*).

A densidade da agarose é da ordem de 1,055 g/mL, portanto, próximo daquele de células animais. Entretanto, o diâmetro médio dessas partículas, segundo o fabricante, é de 30±10 µm, logo superior ao de células animais (em média 15µm). Para que existisse um padrão de comparação, foi mantida a mesma relação entre diâmetro de *beads*/diâmetro do poro do filtro e diâmetro de células/diâmetro do poro do filtro.

O cálculo de eficiência de retenção foi o resultado de um balanço material tendo o *spinfilter* como volume de controle. Como não há geração de *beads*, no equilíbrio, a quantidade de *beads* que entra no *spinfilter* é igual à quantidade que sai. O sistema possui apenas uma corrente de entrada, dada pela vazão de recirculação (Q_R), e duas correntes de saída: uma que é definida pela vazão específica de alimentação (Q_D) e outra que é dada por

 (Q_R-Q_D) que, na prática, seria a vazão de retorno ao biorreator (Figura 4.3). Ou seja, em uma situação ideal, com 100% de eficiência, a quantidade de *beads* que entra no dispositivo pela corrente (Q_R), tem que ser igual à quantidade de *beads* que sai pelas correntes (Q_D e Q_R-Q_D) (Figura 4.3).

Assim, em todos os ensaios, foram retiradas, em intervalos definidos, duas amostras para obtenção da concentração de *beads*: uma diretamente da corrente (Q_R-Q_D), e outra de dentro do *Spinner* que, levando em conta a homogeneidade do sistema, é igual à concentração da corrente de recirculação (Figura 4.3).

Entretanto, durante os ensaios do planejamento experimental utilizando o filtro com 40 μ m, foi observado que, quando o *spinfilter* era submetido a altas velocidades de rotação (≥ 400 rpm), os *beads* se depositavam no fundo do *spinfilter*. Fenge et al. (1993) também observaram este fenômeno com rotações acima de 200 rpm. Este comportamento tornou inválida a hipótese de homogeneidade do sistema, de tal forma que foi necessário adotar um novo método de cálculo para estas situações.

Para baixas rotações do *spinfilter*, calculava-se a eficiência de retenção da seguinte maneira: media-se a concentração de *beads* na corrente Q_R-Q_D (Amostra 1) e dividia-se pela concentração média de *beads* na entrada, obtida pela a média aritmética de todos os valores de concentração do *Spinner* (Amostra 2), durante o ensaio (Figura 4.3, Equação 4.1). Isso era feito, pois neste caso, a hipótese de homogeneidade do sistema era válida e, assim, a média era uma maneira de amenizar os erros de contagem. Para altas rotações, por outro lado, a hipótese de homogeneidade tornou-se inválida, portanto optou-se por calcular a concentração de *beads* na corrente Q_R-Q_D (Amostra 1) e dividir pela concentração inicial de *beads* na entrada do *spinfilter*, isto é, a concentração inicial do *Spinner* (Figura 4.3, Equação 4.2).

Os resultados de eficiência de retenção (E) obtidos nos experimentos foram utilizados para se obter um modelo de superfície de resposta desta variável, em relação às três variáveis controladas (D, Q_R , ω). A figura 5.39 mostra duas superfícies de resposta que resultam desse modelo, uma quando a rotação foi de 150 rpm e a outra, quando foi de 400 rpm. Ambas as representações foram obtidas com o *Software Design Expert*.



Figura 5.39 - Superfícies de resposta obtidas do *software Design-Expert* para as rotações de: (a) 150 rpm e; (b) 400 rpm.

Pode-se perceber que os valores máximos de E foram obtidos nas faixas intermediárias de D e Q_R (aproximadamente 5 d⁻¹ e 65mL/min, respectivamente). Entretanto, observa-se que a variável ω tem grande influência na retenção de partículas: para ω =150rpm (Figura 5.39a), obtêm-se E na faixa de 70% a 100%; para ω =400 rpm (Figura 5.39b), E varia entre 10 e 50%. A simulação do *software* fornece várias alternativas para maximização do E, entre elas: D=5,58 d⁻¹, Q_R= 80,79 mL/min e ω =247,22 rpm (Figura 5.40), valor semelhante de ω foi obtido por Hufford (2005).

A análise feita pelo *software* apresenta ainda a equação obtida para eficiência de retenção em função das 3 variáveis estudadas:

$$\boldsymbol{E} = 84, 5 + 10, 9. \, \boldsymbol{D} + 0, 73. \, \boldsymbol{Q}_{R} - 25, 4. \, \boldsymbol{W} - 8, 1. \, \boldsymbol{D}^{2} - 8, 1. \, \boldsymbol{Q}_{R}^{2} - 12, 9. \, \boldsymbol{W}^{2}$$
(5.1)

Esta equação permite a simulação da retenção para novos valores de D, Q_R , ω , neste sistema.

Com o filtro de 20 μ m, foram feitos apenas os 8 pontos fatoriais. A eficiência de retenção ficou próxima de 100% para todos os ensaios realizados, o que era esperado, uma vez que o diâmetro dos *beads* era, em média, 50% maior (30 μ m) do que a malha do filtro.

🟠 C:\Users\Public\Docum	ents\C)X8Trial data	Cassia_150812.	.dxp - Design	-Expert 8.0.7.	1																	- 0	X
File Edit View Display	/ Optio	ons Design	Tools Help	Tips																				
D 🚅 🖬 🐰 🖻 🖻	6	? 😵																						
Notes for Cassia_150812		🔨 Criteria	J Solutions	: 🔀 Gra	phs																			
Design (Actual)	-		J																					
Graph Columns	So	lutions 1	2 3 4	5 6	7 8	9 10	11 12 1	3 14 15	16	17	18 1	19 2	0 21	22	23	24	25	26	27	28	29	30 3	32	33
Section Section									_															•
- Analysis									<u></u>															
R1:Ret (Analyzed)		Solutions																						
Dptimization		Number	D	QR	ROT	Ret	Desirability																	
- 🕅 Numerical			<u>5.58</u>	<u>80.79</u>	<u>247.22</u>	<u>92.4197</u>	<u>1.000</u>	elected																
- 🌇 Graphical		2	7.00	100.00	150.00	92.3971	1.000																	
- Î Point Prediction		3	5.96	89.07	166.98	99.0667	1.000																	
Confirmation		4	5.16	94.29	184.72	94.2731	1.000																	
		5	5.96	71.93	166.98	98.426	1.000																	
		6	5.45	69.21	188.43	95.345	1.000																	
		7	5.47	84.38	227.92	94.699	1.000																	
		8	7.00	61.00	150.00	90.9392	1.000																	
		9	4.20	70.30	184.76	90.3687	1.000																	
		10	5.20	69.35	165.13	95.6214	1.000																	
		11	5.84	98.83	202.15	91.799	1.000																	
		12	4.80	88.05	163.06	96.1816	1.000																	
			4.95	64.19	150.63	91.6156	1.000	>																
Solutions Tool		14	4.71	66.28	188.51	90.8431	1.000																	
Report		15	6.32	73.45	222.27	95.2233	1.000																	
Ramos		16	6.54	76.32	234.07	94.4144	1.000																	
Bar Graph		17	5.98	98.76	181.70	93.3687	1.000																	
Pop-Out View		18	5.19	90.17	240.07	90.7738	1.000																	
		19	6.65	66.27	180.69	94.8668	1.000																	
		20	6.79	76.89	225.66	95.2924	1.000																	
		21	6.85	94.00	229.26	91.773	1.000																	
		22	6.65	77.89	227.71	95.4054	1.000																	
		23	3.99	75.46	172.87	91.3367	1.000																	
		24	6.00	97.75	187.21	93.8078	1.000		-															

Figura 5.40 - Resultados da simulação do software Design-Expert.

5.2.2.1 <u>Ensaio realizado com a linhagem rHeLaHyCDSp</u>, em biorreator operado em perfusão

Após a realização dos estudos cinéticos com a linhagem rHeLaHyCDSp, em biorreator para verificar as melhores concentrações iniciais de glicose (8 g/L) e glutamina (700 mg/L) e a concentração de pO₂ (30%) nos Meios 6a e 6b e, de ter realizado também, um estudo de maximização de retenção celular em *spinfilter* externo com *beads* de agarose, foi realizado o ensaio conduzido em modo perfusão (Ensaio 60, Tabela 4.4).

A escolha da condição de operação do *spinfilter* externo foi baseada nas opções de maximação de E (retenção) fornecidas pela figura 5.37. Os valores das variáveis adotados neste experimento foram: D=4,95 d⁻¹ ou 0,21 h⁻¹, Q_R= 64,19 mL/min e ω =150,63 rpm (Condição número 13, Figura 5.40). Por se tratar de um experimento com células e não com *beads*, optou-se por condições medianas de valores de D e Q_R. A escolha da ω foi por ter um valor praticamente igual ao valor de agitação do impelidor, utilizado nos ensaios anteriores com esta linhagem.

O Ensaio 60 (Tabela 4.4) começou com uma batelada. Após 77 horas de ensaio, no meio da fase de crescimento exponencial, com um μ_{XMAX} de 0,033 h⁻¹, concentração celular

de 2,21x10⁶ cel/mL e viabilidade celular de aproximadamente 97,7% (valores considerados ideais, quando comparados com todos os outros ensaios com a mesma linhagem, principalmente com o Ensaio 50) foi iniciada a operação em modo perfusão, com a alimentação dos 3 tipos de meio (Meio 6b): meio com glicose, meio com glutamina e meio sem nenhuma adição, cujas as vazões estavam calculadas para um tempo de residência de 24 horas.

Após 3 horas do início da perfusão, a concentração e a viabilidade celular diminuíram em, aproximadamente 30% ($6.5x10^5$ cel/mL) e 85%, respectivamente. Após 14 horas do início, as células haviam desaparecido, provavelmente devido à lise celular, que poderia ter ocorrido em um dos seguintes momentos: a) quando as células passavam pela bomba; ou b) quando elas passavam pelo *spinfilter* externo. Além disso, o caminho que a célula fazia ao sair do biorreator, passar pelo *spinfilter* externo e retornar ao biorreator, também pode ser considerado uma condição adversa, por não existirem controles de temperatura e oxigênio dissolvido, mas que não parece estar propriamente relacionada à lise celular.

Algumas tentativas foram feitas para solucionar estes problemas. Foram realizados 3 conjuntos de ensaios em *Spinner*, mantidos em incubadora com atmosfera de 5% (v/v) de CO_2 e 37 °C. Os 2 primeiros conjunto de ensaios utilizaram as mesmas bombas peristálticas do Ensaio 60, tipo: *drive* (modelo 7520-40, Masterflex, EUA), cabeçote (77200-50, Easy-Load II, EUA) e mangueira (6485-14, Masterflex, EUA).

No primeiro conjunto de ensaios, 2 *Spinners* foram inoculados com 200 mL de Meio 6b (8 g/L de GLC_0 e 700 mg/L de GLN_0) e concentração inicial de aproximadamente $8,5x10^5$ cel/mL com viabilidade de 98%. Os ensaios foram operados em um sistema fechado, onde o meio com células era bombeado para fora do *Spinner*, e, em seguida, retornava ao mesmo. As vazões das bombas eram de 40 e 80 mL/min. Em ambos os ensaios, observou-se que, após 3 horas, a viabilidade celular era de 0%.

No segundo conjunto de ensaios, 3 *Spinners* foram inoculados com 200 mL de Meio 6b (8 g/L de GLC₀, 700 mg/L de GLN₀) ao qual adicionou-se 0,1% p/v de pluronic F68 para diminuir o efeito do cisalhamento. A concentração celular inicial foi de aproximadamente $9,3x10^5$ cel/mL com viabilidade de 98%, no mesmo sistema fechado do primeiro conjunto de ensaios. As vazões das bombas eram de 20, 40 e 80 mL/min, e o resultado obtido foi o mesmo para os três *Spinners*: após 3 horas, a viabilidade celular também atingiu 0%.

Em um último conjunto de ensaios, utilizou-se o mesmo esquema de experimento, mas com um tipo de bomba diferente: uma bomba dosadora, que poderia causar menores tensões de cisalhamento às células (Dosing Pump FE 211, B. Braun, Alemanha). Inoculou-se 2 *Spinners* com 200 mL de Meio 6b (8 g/L de GLC_0 , 700 mg/L de GLN_0 e adição de 0,2% e 0,4% p/v de pluronic F68,) e aproximadamente 7,8x10⁵ cel/mL com viabilidade celular de 99%. Mais uma vez, a viabilidade celular também atingiu 0% após 4 horas de experimento.

A fragilidade da linhagem rHeLaHyCDSp ao passar pelas bombas, a falta de bombas capazes de causar menores tensões de cisalhamento às células na Instituição e a falta de verba no projeto para comprá-las, impossibilitaram a realização do ensaio em modo perfusão com esta linhagem.

5.3 Estudos com a linhagem SKHep

Após os problemas identificados com a linhagem rHeLa, os pesquisadores do Hemocentro de Ribeirão Preto enviaram para o IPT uma nova linhagem de células humanas transfectadas (rSkHep) para produção de rFVIII, que havia sido caracterizada por eles quanto: a) à presença do mRNA relativo ao FVIII por RT-PCR convencional ou sobre o nível de mRNA por RT-PCR em tempo real; b) à presença da proteína citoplasmática por citometria de fluxo; c) à presença da proteína no sobrenadante da cultura de células por "*western blot*" e, d) à atividade biológica da proteína recombinante por três métodos distintos (TTPa, Cromogênico e ELISA). Em seguida, foi realizado também no IPT um RT-PCR pela pesquisadora Dra. Patrícia Léo, para verificar se, efetivamente, o gene de produção de rFVIII estava inserido no genoma desta célula e obteve-se resultado positivo.

Para atingir o processo mais adequado de produção da proteína de interesse, foram realizados estudos cinéticos com a nova linhagem. Nos itens a seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos com a linhagem rSKHep.

5.3.1 Cinética em frasco T em meio com SFB

Inicialmente, procurou-se caracterizar o crescimento, o metabolismo e a produção da linhagem rSKHep, nas condições originais de cultura, em meio DMEM, contendo 10% (v/v) de SFB (Meio 1a), empregando frascos tipo T como sistema de cultura. Foram realizados dois estudos cinéticos (Ensaios 61 e 62, Tabela 4.6), que são representativos da linhagem. Por uma questão de simplificação do documento e pelo fato dos dois ensaios serem muito semelhantes, apenas os resultados do Ensaio 61 serão mostrados (Figura 5.41).



Figura 5.41 - Resultados do Ensaio 61 (Tabela 4.6), alisados através do método spline. Linhagem rSKHep, Meio 1a, em frascos T. (a) Concentração e viabilidade celular; (b) Confluência; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; (f) pH; e (g) Produção de rFVIII . As linhas verticais indicam o instante no qual ocorre o final da fase de crescimento exponencial (azul contínua), o fim do crescimento celular, o início da morte celular e a máxima produção de rFVIII (preta tracejada).

O perfil de crescimento mostra um tempo de aproximadamente 20 horas de lag (Figura 5.41a). O crescimento exponencial ocorre com $\mu_{X,MAX}$ de 0,0287 h⁻¹. Após o final da fase de crescimento exponencial, observa-se um período de 20 horas de crescimento linear, o qual é seguido imediatamente do início da morte celular (Figura 5.41a).

Ao final da fase exponencial, ainda há disponibilidade de glicose (Figura 5.41c) e, pelo que é possível inferir a partir do perfil de NH_4^+ , também há disponibilidade de glutamina (Figura 5.41e). Assim, não há indícios de que a interrupção da fase exponencial ocorre devido a uma limitação por estes substratos.

A confluência atinge 100% aproximadamente 30 horas antes do término da fase exponencial (Figura 5.41b), o que sugere que este instante também não ocorre por falta de espaço para adesão. Além disso, a concentração celular aumenta em quase 90% depois de atingida a confluência total, o que indica que esta linhagem tem capacidade de compactação do tapete celular (Figura 5.41a e 5.41b).

A concentração de NH_4^+ no instante final da exponencial é de 37,4 mg/L e não parece ser alta o suficiente para provocar inibição (Figura 5.41e). Por outro lado, a concentração de lactato atinge concentração de 2,8 g/L e pode ser um potencial inibidor do crescimento celular (Figura 5.41d).

Os dados de rFVIII mostram que a concentração de proteína aumenta mesmo após a interrupção da fase exponencial (Figura 5.41g). A disponibilidade de glicose durante todo o período do ensaio indica que este substrato não limita a produção de rFVIII. No entanto, a produção de NH_4^+ é interrompida em 140h, o que pode sugerir que, no ponto onde a concentração de rFVIII começa a decair, o cultivo encontra-se em uma condição de limitação de glutamina, de forma que a produção de rFVIII é interrompida. Este ensaio apresentou um $Y_{rFVIII/X}$ de 0,340 UI/10⁶ células e uma concentração máxima de rFVIII de 5,27 UI/mL (Figura 5.41g).

Também deve-se considerar que durante todo o período do ensaio, a proteína está sujeita a uma condição adversa (37 °C), sem controles de pO_2 e pH e, portanto, sempre há degradação. Desta forma, pode-se considerar que o decréscimo da concentração de rFVIII é uma consequência de mais de um efeito.

5.3.2 Adaptação ao crescimento em suspensão em meio isento de SFB

Várias tentativas foram feitas com os Meios 1a, 4 e 6a, para adaptar a linhagem rSKHep ao cultivo em suspensão. Porém, como havia sido feito todo um estudo com a linhagem rHeLa no Meio 6a, a maior parte das estratégias de adaptação foram direcionadas então, para este meio. Dentre elas pode-se destacar: a) redução gradual do SFB (aproximadamente 25% a cada subcultivo); b) adições do biosurfactante pluronic F68 em concentrações que variaram entre 0,1 a 0,3% (p/v); c) diminuição da osmolalidade do Meio 6a (270 mOsm/kg) e adição de 0,1% (p/v) de pluronic F68. Porém, nenhuma destas tentativas obteve sucesso.

A figura 5.42 apresenta o melhor resultado obtido com o Meio 6a, suplementado com 0,1% de pluronic F68. Após 119 dias de cultivo com meio isento de SFB, foi preparado o banco de preservação, pois julgou-se que o processo de adaptação estava encerrado. No entanto, todas as ampolas reativadas deste banco apresentaram, inicialmente, um crescimento muito baixo e morreram após 2 a 3 repiques.



Figura 5.42 - Adaptação da linhagem rSkHep ao cultivo em meio isento de soro (Meio 6a) em frasco Spinner. (a) Concentração celular (X_V); (b) Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{X,MÁX}) e tempo de geração (t_{GERAÇÃO}); (c) porcentagem de SFB; (d) Viabilidade celular. As linhas horizontais da Figura 5.42b indicam os valores médios de μ_{X,MÁX} (azul contínua) e de tgeração (rosa contínua).

As dificuldades de adaptação ao meio isento de soro (Meio 6a) na condição em suspensão, sugerem o uso de outras formulações de meio sem soro, notadamente aquelas desenvolvidas especificamente para o modo aderido. No entanto, a falta de recurso financeiro para adquirir estes meios e o tempo disponível para execução do projeto fez com que fosse adotada uma nova estratégia para o prosseguimento do trabalho.

Optou-se por outro sistema de cultivo, para atender os objetivos de ampliação de escala, com alta densidade celular, alta velocidade de processamento e controle preciso das variáveis, no qual as células aderem sobre pequenas partículas microscópicas, ditas microcarregadores. Os processos com microcarregadores, além de apresentarem uma relação interessante superfície/volume, podem ser utilizados em biorreatores mais simples (agitado ou airlift), normalmente operando em processo contínuo com reciclagem total de células (ABRANCHES et al., 2007; LANTIERI, 2006; WANG; OUYANG, 1999). Atualmente, as aplicações para o cultivo em microcarregador são muitas e variam desde o estudo de células *in vitro* e estudos de diagnósticos, em volumes de cultivo de alguns mililitros, até a produção em grande escala de produtos celulares, como é o caso da produção de proteínas recombinantes (BLUML, 2004).

Nos itens a seguir serão apresentados e discutidos os resultados de ensaios preliminares para a utilização de microcarregadores, sendo eles, a eficiência de plaqueamento e os ensaios em *Spinners*. Na sequência, serão mostrados os estudos cinéticos em biorreator em modo batelada e, finalmente, o ensaio em perfusão.

5.3.3 Estudos com microcarregadores

5.3.3.1 Eficiência de plaqueamento

A eficiência de plaqueamento da uma linhagem celular é um parâmetro que indica a capacidade de proliferação da linhagem ao ser passada para uma nova subcultura. Este parâmetro influencia diretamente algumas variáveis no estágio inicial do cultivo com microcarregadores, como o volume, a agitação e suplementos adicionados ao meio de cultura. Além disso, a eficiência de plaqueamento indica qual proporção entre células e microcarregadores deve ser utilizada para otimizar a adesão e o crescimento celular. A tabela 5.14 mostra a relação entre a eficiência de plaqueamento e estas variáveis.

Define-se a eficiência de plaqueamento (E.P.) (ou eficiência de clonagem) (FRESHNEY, 2005) como a porcentagem de células iniciais inoculadas que formam colônias, quando semeadas à baixa densidade (2 a 50 cél/cm²) em Placa de Petri. Os valores normalmente encontrados são:

- Células primárias: menor que 10%;
- Células normais diplóides: entre 10 e 30%;
- Linhagens de células imortalizadas: maior que 30%.

 Tabela 5.14 - Influência da eficiência de plaqueamento em variáveis do cultivo.

]	Eficiência de plaquea	nento
Variável	<10%	10-30%	>30%
Relação inicial células/microcarregador	Alta (>10)	Intermediária (5-10)	Baixa (<5)
Volume inicial	Baixo (20 a 30% do volume final)	Intermediário (30 a 60% do volume final)	Alto (100% do volume final)
Agitação inicial	Estático/intermitente	Contínua (aprox. 10 rpm)	Contínua (40 a 60 rpm)
Adição de suplementos ao meio de cultura	Necessária	Vantajosa	Desnecessária

Fonte: GE Healthcare (2005).

A eficiência de plaqueamento das células rSKHep utilizadas neste projeto foi ensaiada em duplicata e os resultados estão indicados na tabela 5.15.

Amostra	Nº teórico de células semeadas	Nº de colônias por Placa de Petri	Eficiência de plaque amento (%)	Média	DP	CV(%)	
1	200	180	90,00	97.25	10.25	10.54	
2	200	209	104,50		10,20	10,01	
1	500	417	83,40	04 10	0.00	1 17	
2	300	424	84,80	84,10	0,99	1,17	

Tabela 5.15 - Eficiência de plaqueamento das células SKHep.

O valor médio da E.P. foi superior a 30%. Segundo a GE Healthcare (2005), como regra geral, para esse nível de E.P., não são requeridos cuidados especiais para a colonização inicial dos microcarregadores, tais como a suplementação de nutrientes, agitação intermitente ou volumes iniciais de cultivo baixos (Tabela 5.14). A inoculação das células rSkHep pode, portanto, ser feita com concentrações menores que 5 células por microcarregador. A partir desse resultado foram realizados os ensaios em frasco *Spinner*.

5.3.3.2 Ensaios em frascos Spinner

Foram feitos dois conjuntos preliminares de ensaios utilizando microcarregadores. O primeiro, com objetivo de verificar a melhor relação entre células e microcarregadores, tomando como base o resultado obtido no ensaio de eficiência de plaqueamento e mantendose fixa a concentração inicial de microcarregadores. No segundo conjunto, já utilizando a relação célula/microcarregador considerada ótima a partir dos resultados dos primeiros ensaios, variou-se apenas a concentração de microcarregadores. Neste último conjunto de ensaios, foram repetidas duas condições do primeiro conjunto, que foram utilizadas como referência para validar ambos os conjuntos.

5.3.3.2.1 Influência do número de células iniciais por microcarregador (X_{MIC,0})

No primeiro conjunto de ensaios (Ensaios 63 a 66, Tabela 4.6), foram avaliadas as relações de 1, 3, 5 e 8 para a variável número de células iniciais por microcarregador ($X_{Mic,0}$), fixando a concentração de microcarregadores em 3 gmic/L. Os resultados estão mostrados na figura 5.43 e as comparações entre as principais grandezas cinéticas obtidas neste conjunto e em repetições estão mostradas na figura 5.44.

Todos os ensaios apresentam extensos tempos de adaptação, ou seja, sem crescimento celular (Figura 5.43a). Em parte, isto não era esperado, uma vez que, a partir do valor de eficiência de plaqueamento obtido, as condições iniciais foram estabelecidas visando otimizar o crescimento e adesão celular. No entanto, a concentração de células inoculada era muito baixa e pode ter influenciado neste resultado. Observa-se que alguns ensaios apresentam uma fase estacionária após o final do crescimento (Ensaios com 3 e 8 cel/mic), enquanto que nos ensaios com 1 e 5 cel/mic, o final do crescimento é seguido pelo início da morte celular.

Para todos os ensaios foi calculado um índice de confluência (IC) (Figura 5.43b), para que os resultados obtidos fossem comparáveis àqueles dos ensaios em frascos T. Observa-se que os ensaios com 5 e 8 cel/mic não atingiram confluência total. Por outro lado, os ensaios com 1 e 3 cel/mic atingiram confluência de 100% antes do final do crescimento celular, o que reforça a conclusão de que esta linhagem tem capacidade de compactação do tapete celular.



Figura 5.43 - Resultados dos ensaios com 1, 3, 5 e 8 células por microcarregador (Ensaios 63 a 66, respectivamente, Tabela 4.6) com a linhagem rSKHep no Meio 1a. (a) Concentração celular (Xv); (b) Índice de confluência; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; e (f) Produção de rFVIII. As linhas verticais indicam o instante de fim de exponencial. As linhas contínuas azul e vermelha estão sobrepostas. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE C).

Em nenhum dos ensaios há o esgotamento de glicose (Figura 5.43c). De forma análoga aos ensaios com a linhagem rHeLa, a partir do perfil de produção de NH_4^+ (Figura 5.43e), pode-se inferir que não houve esgotamento de glutamina. Desta forma, têm-se indícios de que o crescimento exponencial não é limitado pelo esgotamento de nenhum destes substratos.

As concentrações de lactato atingidas neste instante estão na faixa entre 1,5 e 1,7 g/L e não parecem exercer efeitos de inibição no crescimento celular (Figura 5.43d e Tabela 5.16). Observa-se que, a partir do início do crescimento exponencial até o fim do crescimento, as concentrações de lactato nos ensaios com 3 e 8 cel/mic são mais altas que nos outros ensaios (Figura 5.43d). Isto pode indicar que o crescimento celular nestes ensaios foi afetado mais

cedo pelos efeitos inibitórios das altas concentrações de lactato, o que explicaria a existência de uma fase estacionária.

Por outro lado, em t_{EXP} , os valores de NH_4^+ em todos os ensaios estão entre 60-70 mg/L (Figura 5.43b e Tabela 5.16). Estes valores já podem ser considerados altos, de forma que este subproduto pode ser considerado um potencial inibidor ao crescimento. Deve-se considerar também que estes ensaios não tem controle de pH ou de oxigênio dissolvido, de forma que estes fatores também podem ter exercido influência nos resultados.

O início da morte celular ocorre, em todos os ensaios, no instante em que a concentração de lactato atinge entre 2,2 e 2,5 g/L (Tabela 5.16). Estes valores são considerados altos e poderiam estar relacionados com o início desta fase. No entanto, os ensaios em biorreator, que serão mostrados a seguir, apresentaram concentrações maiores de lactato (ver item 5.3.3.3), mostrando que esta concentração não causa a morte celular.

A condição com 1 cel/mic apresentou valores máximos de velocidade específica de crescimento de 0,039 h⁻¹ (Figura 5.44e, Tabela 5.17) e de crescimento celular de 1x 10^6 cel/mL (Figura 5.44a, Tabela 5.17). Estes valores foram 28% e 11% maiores, respectivamente, que a segunda melhor condição (3 cel/mic). Uma vez que a disponibilidade de área foi a mesma em todos os ensaios 93 gmic/L), esperava-se que todas as condições tivessem o mesmo $\mu_{X,MAX}$ e apresentassem diferenças apenas entre os tempos de permanência na fase exponencial de crescimento (t_{EXP}). No entanto, o aumento do número de células por microcarregadores causou uma redução de 60% na velocidade específica máxima de crescimento (Figura 5.44e, Tabela 5.17) e de 63% no crescimento celular (Figura 5.44a, Tabela 5.17), sugerindo que o aumento do número de células por microcarregadores tem um efeito semelhante a uma inibição, desfavorecendo o crescimento celular.



Figura 5.44 - Efeito do n° de células por microcarregador (X_{Mic}) sobre grandezas cinéticas com a linhagem rSKHep no Meio 1a. (a) Máxima velocidade específica de crescimento ; (b) Crescimento celular; (c) Fator de conversão de glicose a células; (d) Fator de conversão de glicose a lactato; (e) Fator de produção de amônio por célula; e (f) Fator de produção de rFVIII por célula. Os pontos triangulares são referentes às repetições das condições.

Foi possível observar uma mudança no metabolismo conforme se alterou $X_{Mic,0}$. A produção de células por glicose consumida ($Y_{X/GLC}$) (Figura 5.44c) foi aproximadamente 2,3 vezes maior nos ensaios com 1 e 3 cel/mic do que nas outras condições. Por outro lado, os valores de $Y_{LAC/GLC}$ (Figura 5.44d) obtidos foram os mesmos para todas as condições, sugerindo que, metabolicamente, a diminuição em $X_{Mic,0}$ não interferiu na partição da glicose entre as vias oxidativa (TCA) e fermentativa (produção de lactato). No entanto, deve-se ressaltar que estes ensaios não possuem dados de alanina, de forma que deve-se considerar a possibilidade da variação de $X_{MIC,0}$ ter alterado o fluxo de glicose através da via da alaninotransferase.

A produção de amônia (Figura 5.44e) também foi mais baixa nas condições com menos células por microcarregador (aproximadamente 2,5 vezes), indicando melhor aproveitamento da glutamina disponível no meio nesta condição.

Como a tripsinização de células é mais difícil em ensaios com microcarregadores, foi questionada a contagem destes ensaios e, por isso, decidiu-se repetir as duas melhores condições para validar este quadro de ensaios.

Estas repetições foram realizadas juntamente com o segundo conjunto de ensaios e estão explicitadas na figura 5.44, em vermelho (Ensaios 67 e 71, Tabela 4.6). Pode-se observar que os resultados são semelhantes e, portanto, os dois conjuntos de dados podem ser validados.

A produção de rFVIII foi avaliada nas condições com 1 e 3 células por microcarregador. Diferentemente dos resultados obtidos no crescimento celular, a produção de rFVIII foi 20% maior na segunda condição, considerando as duas repetições (Figura 5.44f).

													(c	ontinuação)			
•	Nomeno		Condiçõe	es Inicia	is	•	Exponencial										
Ensaio	Lab.	cel/mic	gmic/L	pН	Xv (cel/mL)	t_{LAG} (h)	$t_{EXP}(h)$	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	LAC (g/L)	NH_4 + (mg/L)	rFVIII (UI/mL)			
63	SpF8_46	8	3	7,40	1,08E+05	20,17	116,67	4,32E+05	3,24E+05	6,69	2,23	1,79	58,00	ND			
64	SpF8_47	1	3	7,40	2,03E+04	68,17	145,17	5,92E+05	5,72E+05	7,04	2,59	1,55	70,83	2,136			
65	SpF8_48	3	3	7,40	3,59E+04	20,17	122,67	8,90E+05	8,55E+05	6,91	2,45	1,67	62,92	0,956			
66	SpF8_49	5	3	7,40	8,24E+04	68,17	145,17	3,56E+05	2,74E+05	6,86	2,37	1,67	72,02	ND			
67	SpF8_50	1	3	7,40	1,94E+04	48,17	172,50	1,18E+06	1,16E+06	6,77	1,55	2,07	68,04	1,400			
68	SpF8_51	1	6	7,40	3,52E+04	48,17	165,00	8,10E+05	7,75E+05	6,67	1,48	1,94	68,04	0,702			
69	SpF8_52	1	9	7,40	4,69E+04	48,17	165,00	1,10E+06	1,05E+06	6,65	1,13	1,92	85,32	2,324			
70	SpF8_53	1	15	7,40	1,28E+05	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
71	SpF8_54	3	3	7,40	3,98E+04	48,17	145,50	1,15E+06	1,11E+06	6,73	1,41	2,04	62,04	3,276			

Tabela 5.16 - Valores das variáveis de estado de todos os ensaios realizados *em Spinner* com a linhagem rSKHep no Meio 1a (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível).

	Nomeno		Condições Iniciais				Fim do Crescimento									
Ensaio	Lab.	cel/mic	gmic/L	pH	Xv (cel/mL)	$t_{FIM}(h)$	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	LAC (g/L)	$NH_4^+(mg/L)$	rFVIII (UI/mL)			
63	SpF8_46	8	3	7,40	1,08E+05	122,67	4,54E+05	3,46E+05	6,73	2,03	1,92	60,47	ND			
64	SpF8_47	1	3	7,40	2,03E+04	188,33	1,02E+06	1,00E+06	7,17	1,42	2,26	85,98	1,994			
65	SpF8_48	3	3	7,40	3,59E+04	129,00	9,10E+05	8,74E+05	6,91	2,24	1,8	65,66	ND			
66	SpF8_49	5	3	7,40	8,24E+04	189,00	3,99E+05	3,17E+05	6,69	1,43	2,13	81,82	ND			
67	SpF8_50	1	3	7,40	1,94E+04	189,50	1,25E+06	1,23E+06	6,60	1,24	2,25	73,72	2,352			
68	SpF8_51	1	6	7,40	3,52E+04	189,50	1,09E+06	1,05E+06	6,67	1,14	2,08	79,95	1,320			
69	SpF8_52	1	9	7,40	4,69E+04	165,00	1,10E+06	1,10E+06	6,65	1,13	1,92	85,32	2,324			
70	SpF8_53	1	15	7,40	1,28E+05	-	-	-	-	-	-	-	-			
71	SpF8 54	3	3	7,40	3,98E+04	165,00	1,14E+06	1,10E+06	6,67	0,96	2,21	70,18	1,988			

	Nomono		Condiçõe	es Inicia	is		Morte									
Ensaio	Lab.	cel/mic	gmic/L	pН	Xv (cel/mL)	t _{MORTE} (h)	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	LAC (g/L)	$NH_4^+(mg/L)$	rFVIII (UI/mL)			
63	SpF8_46	8	3	7,40	1,08E+05	165,17	4,54E+05	3,46E+05	6,62	1,25	2,31	70,56	ND			
64	SpF8_47	1	3	7,40	2,03E+04	188,33	1,02E+06	1,00E+06	7,17	1,42	2,26	85,98	1,994			
65	SpF8_48	3	3	7,40	3,59E+04	188,33	9,12E+05	8,76E+05	6,65	0,83	2,40	96,66	0,788			
66	SpF8_49	5	3	7,40	8,24E+04	189,00	3,99E+05	3,17E+05	6,69	1,43	2,13	81,82	ND			
67	SpF8_50	1	3	7,40	1,94E+04	189,50	1,25E+06	1,23E+06	6,60	1,24	2,25	73,72	2,352			
68	SpF8_51	1	6	7,40	3,52E+04	189,50	1,09E+06	1,05E+06	6,67	1,14	2,08	79,95	1,320			
69	SpF8_52	1	9	7,40	4,69E+04	165,00	1,10E+06	1,10E+06	6,65	1,13	1,92	85,32	2,324			
70	SpF8_53	1	15	7,40	1,28E+05	-	-	-	-	-	-	-	-			
71	SpF8_54	3	3	7,40	3,98E+04	165,00	1,14E+06	1,10E+06	6,67	0,96	2,21	70,18	1,988			

Tabela 5.16 - Valores das variáveis de estado de todos os ensaios realizados *em Spinner* com a linhagem rSKHep no Meio 1a (t_{EXP} – final da fase de crescimento exponencial; t_{FIM} – fim de crescimento; t_{MORTE} – início da morte celular; ND – não disponível).

	Nomeno		Condiçõe	es Inicia	is		rFVIII _{MÁX}									
Ensaio	Nome no Lab.	cel/mic	gmic/L	pН	Xv (cel/mL)	t (h)	X (cel/mL)	∆X (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	LAC (g/L)	$NH_4^+(mg/L)$	rFVIII (UI/mL)			
63	SpF8_46	8	3	7,40	1,08E+05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
64	SpF8_47	1	3	7,40	2,03E+04	145,17	5,70E+05	5,70E+05	7,04	2,55	1,55	70,83	2,136			
65	SpF8_48	3	3	7,40	3,59E+04	145,50	9,20E+05	9,20E+05	6,83	1,69	2,02	75,32	3,952			
66	SpF8_49	5	3	7,40	8,24E+04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
67	SpF8_50	1	3	7,40	1,94E+04	189,50	1,25E+06	1,25E+06	6,60	1,24	2,25	73,72	2,352			
68	SpF8_51	1	6	7,40	3,52E+04	216,75	8,16E+05	8,16E+05	6,53	0,86	2,10	87,12	1,728			
69	SpF8_52	1	9	7,40	4,69E+04	145,50	7,80E+05	7,80E+05	6,70	1,54	1,73	75,72	3,012			
70	SpF8_53	1	15	7,40	1,28E+05	-	-	-	-	-	-	-	-			
71	SpF8_54	3	3	7,40	3,98E+04	1,46E+02	1,15E+06	1,11E+06	6,73	1,41	1,94	62,04	3,276			

de crescimento exponenciar, t_{FIM} – fini de crescimento, t_{MORTE} – inicio da morte cerurar, ND – nao disponíver).

Tabela 5.17 - Valores das grandezas cinéticas de todos os ensaios realizados em Spinner com a linhagem rSKHep no Meio 1a.

	<u> </u>		Condiçõ	es Iniciai	5		Grandezas Cinéticas								
Ensaio	Nome no Lab.	cel/micc	micc/L	pH	Xv (cel/mL)	t (h)	$\boldsymbol{Y}_{X/GLC}$ (cel/g)	$\boldsymbol{Y}_{LAC/GLC}\left(g/g\right)$	$\boldsymbol{Y}_{LAC/X}$ (g/cel)	$\boldsymbol{Y}_{NH4/X} \ (mg/10^{6} \ cel)$	$\mu_{X,MAX}(h^{-1})$				
63	SpF8_46	8	3	7,40	1,08E+05	116,67	1,73E+08	0,733	4,13E-09	1,14E-01	0,0155				
64	SpF8_47	1	3	7,40	2,03E+04	145,17	4,00E+08	0,753	2,74E-09	5,98E-02	0,0393				
65	SpF8_48	3	3	7,40	3,59E+04	122,67	1,44E+08	0,695	1,63E-09	4,57E-02	0,0305				
66	SpF8_49	5	3	7,40	8,24E+04	145,17	1,73E+08	0,733	4,71E-09	1,48E-01	0,017				
67	SpF8_50	1	3	7,40	1,94E+04	172,50	4,71E+08	0,748	1,76E-09	3,01E-02	0,0322				
68	SpF8_51	1	6	7,40	3,52E+04	189,50	4,82E+08	0,809	2,08E-09	4,97E-02	0,0277				
69	SpF8_52	1	9	7,40	4,69E+04	165,00	4,82E+08	0,637	1,43E-09	3,73E-02	0,0292				
70	SpF8_53	1	15	7,40	1,28E+05	-	-	-	-	-	-				
71	SpF8_54	3	3	7,40	3,98E+04	145,50	4,22E+08	0,757	1,90E-09	3,33E-02	0,0312				
(¥) T 1	X 7 1	1 1		2 0.07											

(*) Todos os Ys calculados tiveram um $r^2 > 0.97$.

(conclusão)

5.3.3.2.2 Influência da concentração de microcarregadores

No segundo conjunto de ensaios, foram avaliadas três diferentes concentrações de microcarregador (6, 9 e 15 gmic/L), além da condição de 3 gmic/L, repetição da condição anterior, que foi utilizada como referência (Ensaios 67 a 70, Tabela 4.6). Estes experimentos foram realizados com um $X_{MIC,0}$ de 1 cel/mic pois, quando se iniciou este quadro de ensaios, os resultados de rFVIII ainda não estavam disponíveis e, assim, havia-se escolhido a condição com maior crescimento celular.

A expectativa era que, conforme se aumentasse a disponibilidade de área, o crescimento celular aumentasse também. Os resultados obtidos estão mostrados na figura 5.45. As comparações entre as principais grandezas cinéticas obtidas neste conjunto de ensaios estão apresentadas na figura 5.46. As tabelas 5.16 e 5.17 mostram os valores das variáveis nos instantes críticos do cultivo e as grandezas cinéticas calculadas na fase exponencial de crescimento.

Diferentemente do esperado, a condição com menos microcarregadores (3 gmic/L) foi a que apresentou melhores resultados de crescimento e de velocidade específica máxima de crescimento, enquanto que a condição com 15 g/L de microcarregadores não apresentou nenhum crescimento celular, sugerindo que a adição de 15 g/L de microcarregador já inibe o crescimento celular (Figura 5.45a). Resultados semelhantes foram observados em estudos com outras linhagens aderentes (CROUGHAN, 1988; CROUGHAN et al., 1988; LANTIERI, 2006; MUKHOPADHYAY et al., 1992). Este resultado pode ser devido à maior quantidade de choques ocorridos entre microcarregadores na condição com maior concentração de partículas. Neste caso, há maior probabilidade de efeitos danosos por cisalhamento.

Abranches et al. (2007) mostraram que o aumento da concentração de microcarregadores de 0,5 para 3 g/L, em cultivos de células-tronco de murinos, aumentaram os índices de LDH, uma enzima liberada por células animais, quando estas são rompidas durante o cultivo, o que indica que maiores concentrações de microcarregadores geram uma condição mais severa de cisalhamento.


Figura 5.45 - Resultados dos ensaios com variação de concentração de microcarregadores (3, 6, 9 e 15 gmic/L) (Ensaios 67 a 70, Tabela 4.6). (a) Concentração celular (Xv); (b) Índice de confluência; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de amônio; e (f) Produção de rFVIII. As linhas verticais indicam o instante do fim do crescimento exponencial. As linhas contínuas vermelha e tracejada vermelha estão sobrepostas. (As figuras isoladas de cada ensaio encontram-se no APÊNDICE C).

Os resultados de índice de confluência (Figura 5.45b), mais uma vez, são facilmente correlacionados com os perfis de crescimento celular, sendo que a condição de 3 gmic/L foi a única que apresentou compactação do tapete celular.

Mais uma vez, não se observou o esgotamento de glicose em nenhum dos ensaios (Figura 5.45c) e, como comentado no item 5.3.3.2.1, os perfis de NH_4^+ não sugerem o

esgotamento de glutamina (Figura 5.45e). No final da fase exponencial de crescimento dos ensaios com concentrações de 3 a 9 gmic/L de microcarregadores, a concentração de lactato estava próxima de 2 g/L (Figura 5.45d). Esta concentração já pode ser considerada alta e pode exercer um efeito de inibição do crescimento celular. A concentração de NH_4^+ nestes ensaios estava na faixa de 70 a 85 mg/L (Figura 5.45e) e também pode ter exercido efeito inibidor.



Figura 5.46 - Efeito da concentração de microcarregadores sobre grandezas as cinéticas com a linhagem rSKHep no Meio 1a. (a) Máxima velocidade específica de crescimento; (b) Crescimento celular; (c) Fator de conversão de glicose a células; (d) Fator de conversão de glicose a lactato; (e) Fator de produção de amônio por célula e; (f) Máxima concentração de rFVIII.

Também foi observada uma pequena mudança no metabolismo. Ao aumentar a concentração de microcarregadores de 6 para 9 gmic/L, os valores de $Y_{X/GLC}$ (Figura 5.46b e Tabela 5.17) não se alteraram significativamente, mas a produção de lactato por glicose

consumida ($Y_{LAC/GLC}$) diminuiu em 22% (Figura 5.46d e Tabela 5.17), mostrando maior eficiência metabólica nesta última condição, no que se refere à menor produção de subproduto tóxico por substrato consumido. Ainda assim, isto não se reflete em um aumento na produção de células, o que já pode ser um indicativo de ações cisalhantes decorrentes da alta concentração de microcarregadores.

A produção de amônia por células ($Y_{NH4/X}$) apresenta uma queda de 25 % entre 6 e 9 gmic/L. Isto mostra que, apesar da condição ser mais severa em termos de cisalhamento, o aproveitamento da glutamina é melhor, na condição com maior concentração de microcarregadores (Figura 5.46e e Tabela 5.17).

A concentração máxima obtida de rFVIII não parece sofrer influências significativas na faixa de 3 a 9 gmic/L (Figura 5.46f). Para a concentração de 15 g/L, no entanto, observa-se uma queda de 45% na concentração máxima obtida da proteína, indicando que esta concentração de microcarregadores não inibe apenas o crescimento celular, mas também a produção de rFVIII.

5.3.3.3 Ensaios em biorreator operado em modo batelada

Neste conjunto de ensaios, foram testadas duas condições. Primeiramente, avaliou-se o efeito de duas concentrações de microcarregadores no sistema: 3 e 9 gmic/L (Ensaios 73 e 72, Tabela 4.7, respectivamente). Apesar dos ensaios preliminares em *Spinner* mostrarem que a condição com menos microcarregadores apresentava melhores resultados, decidiu-se avaliar estas condições em biorreator, para verificar se num sistema com pH e oxigênio dissolvido controlados, os mesmos resultados se manteriam. O $X_{MIC,0}$ foi de 3 cel/mic para ambos os ensaios. As figuras 5.47 e 5.48 mostram os resultados obtidos nestes ensaios.

Da mesma forma que nos ensaios em *Spinner*, foram observadas fases lag extensas, devido à baixa concentração celular inoculada (Figuras 5.47a e 5.48a). Nos dois ensaios, a fase de crescimento exponencial foi interrompida no instante no qual a concentração de glicose estava próxima de zero (Figuras 5.47a, 5.47c, 5.48a, 5.48c), o que pode indicar que a ausência deste substrato limita o crescimento.



Figura 5.47 - Resultados alisados através do método *spline* do Ensaio 72 (Tabela 4.7), com 9 gmic/L e 3 cel/mic, com a linhagem rSKHep no Meio 1a. (a) Concentração celular (Xv); (b) Índice de confluência; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; e (e) Concentração de amônio. As linhas verticais indicam o instante do fim do crescimento exponencial (vermelha contínua) e o instante do fim do crescimento celular (azul tracejada).



Figura 5.48 - Resultados alisados através do método *spline* do Ensaio 73 (Tabela 4.7), com 3 gmic/L e 3 cel/mic, com a linhagem rSKHep no Meio 1a. (a) Concentração celular (Xv) e Viabilidade celular (Viab.); (b) Índice de confluência; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de glutamina; e (f) Concentração de amônio. As linhas verticais indicam o instante do fim do crescimento exponencial (vermelha contínua) e o instante do fim do crescimento e início da morte celular (azul tracejada).

Não há esgotamento de glutamina durante o Ensaio 73 (Figura 5.48e). A partir do perfil de produção de amônio do Ensaio 72 (Figura 5.47e), pode-se inferir que também não há esgotamento de glutamina neste ensaio.

Em ambos os ensaios, o lactato passa a ser consumido como fonte de carbono no instante em que a glicose se esgota (Figuras 5.47c, 5.47d, 5.48c e 5.48d). Também se observa que as concentrações de lactato atingidas no final da fase exponencial são altas (em torno de 3,5 g/L), e podem exercer algum efeito de inibição ao crescimento celular (Figuras 5.47d e

5.48d). As concentrações de amônio atingidas ao final do crescimento exponencial, por outro lado, não são consideradas altas (aproximadamente 30 mg/L) e, portanto, não se acredita que haja inibição por este subproduto (Figuras 5.44e e 5.45f).

Os perfis de índice de confluência são distintos. O Ensaio 73 (Figura 5.48b) com 3 gmic/L atinge um IC muito próximo de 100%, indicando que toda a área disponível para crescimento foi utilizada. Além disso, o perfil sugere uma compactação do tapete celular logo após o final da fase exponencial de crescimento, quando ainda há crescimento, apesar do índice de confluência estar próximo de 100%. No Ensaio 72 com 9 gmic/L (Figura 5.47b), por outro lado, o índice de confluência máximo obtido foi próximo a 40%, indicando que a maior parte do espaço disponível para adesão não foi utilizado.

A análise dos ensaios também mostra que a utilização de uma concentração de 3 gmic/L implicou em uma velocidade específica máxima de crescimento e um crescimento celular 26% e 30% maiores, respectivamente, que quando se utilizou 9 gmic/L, reproduzindo os resultados observados nos ensaios em *Spinner*. Este resultado reforça a hipótese de que altas concentrações de microcarregadores no sistema implicam no aumento da frequência de choques entre as partículas, o que aumenta as forças de cisalhamentos às quais as células são submetidas, o que já foi observado em trabalhos anteriores (ABRANCHES et al., 2007; CROUGHAN, 1988; LANTIERI, 2006; MUKHOPADHYAY et al., 1993).

Realizou-se as análises de aminoácidos do Ensaio 73, por ter sido a melhor condição entre os dois ensaios estudados. Os valores das concentrações nos instantes críticos – fim da exponencial (t_{EXP}) e fim do crescimento (t_{FIM}) – de cada um dos aminoácidos presentes no meio de cultura estão apresentados na tabela 5.18.

Pode-se observar que, ao término do crescimento exponencial, a cistina foi o aminoácido mais foi consumido (86 % da concentração inicial) e que, potencialmente, pode ter limitado o crescimento. Além da cistina, os aminoácidos mais consumidos foram a metionina, a isoleucina, a leucina e a arginina. A glutamina, como já foi comentado, não parece exercer efeito de limitação, uma vez que está entre os aminoácidos menos consumidos, diferentemente do que se esperava.

A alanina foi produzida durante todo o ensaio, o que sugere que a via da alanina aminotransferase (AlaTA, Figura 3.10) foi favorecida em relação à via de transformação da glutamina em α -cetoglutarato através da glutaminase e da glutamato desidrogenase (Figura 3.10), o que pode ser uma explicação para o fato dos níveis de amônio obtidos serem tão baixos (Figura 5.48f).

	Concentração (mg/L)			Consumo/Produção percentual (%)	
Aminoácidos	Início	t _{EXP}	t _{FIM}	t _{EXP}	t _{FIM}
Arginina	120,00	47,26	46,41	60,62	61,33
Alanina	109,47	343,09	470,41	213,41	329,72
Cistina	4,11	0,57	0,57	86,13	86,13
Fenilalanina	28,92	14,57	16,76	49,62	42,05
Glicina	395,35	260,21	225,59	34,18	42,94
Glutamina	971,00	767,18	576,91	20,99	40,59
Histidina	1103,00	696,22	761,77	36,88	30,94
Isoleucina	9,47	9,47	3,57	0,00	62,30
Leucina	15,07	6,05	5,58	59,85	62,97
Lisina	126,57	105,67	108,33	16,51	14,41
Metionina	7,64	2,82	2,38	63,09	68,85
Prolina	6,10	16,67	26,59	173,28	335,90
Serina	55,43	64,05	61,61	16,00	11,14
Tirosina	15,96	8,90	9,63	44,24	39,66
Valina	20,81	11,72	10,54	43,68	49,35

Tabela 5.18 - Concentração, consumo (em preto) e produção (em vermelho) de aminoácidos
em instantes críticos do cultivo: final do crescimento exponencial (t_{EXP}) e final
de crescimento celular (t_{FIM}) do Ensaio 73 (Tabela 4.7).

Finalmente, efetuou-se um novo teste, cultivando as células com 3 gmic/L e com 3 cel/mic, em meio suplementando com apenas 5% de SFB (Meio 1b) (Ensaio 74, Tabela 4.7). Sabendo que o SFB é o componente mais caro do meio de cultura e considerando o volume de meio utilizado em um ensaio em perfusão, resolveu-se avaliar esta condição, pois, caso os resultados fossem satisfatórios, o custo do ensaio seria menor e, além disso, o custo da etapa de purificação do sobrenadante com a proteína também seria reduzido. A figura 5.49 mostra a comparação entre os resultados de crescimento e produção de rFVIII nas condições com 5 e 10% de SFB (Ensaios 74 e 73, Tabela 4.7, respectivamente).

O ensaio com 10% de SFB apresentou resultados de máxima concentração celular e de máxima concentração de rFVIII respectivamente 2,2 e 4,4 vezes maiores que os resultados obtidos no ensaio com 5% de SFB. Sendo assim, optou-se por realizar o ensaio em perfusão suplementando o meio de cultura com 10% de SFB que, apesar de apresentar custo mais elevado, é uma condição melhor em termos de proteção contra o cisalhamento e produção da proteína.



Figura 5.49 - Comparação entre os ensaios com 5 e 10% de SFB (Ensaios 74 e 73, Tabela 4.7, respectivamente) com a linhagem rSKHep. Resultados alisados através do método *spline* de (a) Concentração celular (Xv); e (b) Produção de rFVIII. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento para o Ensaio 73 (vermelha contínua) e 74 (azul contínua).

Croughan (1988) realizou diversos cultivos de células humanas FS-4 com diferentes concentrações de microcarregadores, em meios contendo 5 e 10% de FCS. Em todos os casos, as condições com 10% de FCS apresentou crescimento e velocidade específica de crescimento maiores que a condição com 5% de FCS.

5.3.3.4 Ensaio em biorreator operado em modo perfusão

Em processos de produção de proteínas recombinantes terapêuticas procura-se alcançar dois objetivos, o primeiro é atingir processos com alta densidade celular para obtenção de concentrações elevadas de produto, o que exige um conhecimento profundo do metabolismo e das cinéticas de produção. A finalidade é reduzir os efeitos limitantes ou inibitórios e garantir o potencial máximo das células, em termos de crescimento e expressão do produto, como mencionado anteriormente. E o segundo objetivo é a alta velocidade de processamento, a fim de preservar a atividade biológica das proteínas (CARSTENS; CLARKE; JENSEN, 2009).

Não foi possível atingir completamente o primeiro objetivo pelo fato de que não foi possível adaptar a linhagem rSKHep ao crescimento em suspensão, em meio isento de SFB. Além disso, os estudos preliminares com microcarregadores mostraram que a concentração inicial destes deveria ser baixa, devido ao efeito do cisalhamento, impossibilitando a obtenção de alta densidade celular no sistema estudado.

Em relação ao segundo objetivo, Konstantinov (2008) perceberam que a labilidade do rFVIII era alta, com perda de 50% da atividade entre 6 e 12 horas. Sendo assim, era desejado

manter-se uma alta velocidade de processamento, a fim de preservar ao máximo a atividade biológica do fator de coagulação, o processo não poderia ser operado em modo descontínuo.

Neste estudo, foi realizado um ensaio em duplicata de degradação da proteína, em frasco *Spinner*, com uma concentração de 3 cel/mic e 3 gmic/L no Meio 1a. As células cresceram em exponencial até aproximadamente 94 horas. Em seguida, centrifugou-se a suspensão, a fim de separar o meio das células e microcarregadores. O meio foi colocado novamente no *Spinner* e incubado em estufa com atmosfera de 5 % (v/v) de CO₂ a 37 °C. Foram retiradas amostras, em intervalos de tempos regulares, para dosagem de rFVIII. A figura 5.50 mostra o resultado deste ensaio.



Figura 5.50 - Estudo da degradação de rFVIII.

Pode-se observar que a perda da atividade da proteína em 24 horas foi de 5% e em 48 horas foi de 65%, valores muito diferentes dos resultados encontrados no trabalho de referência da Bayer (KONSTATINOV, 2008). Este resultado sugere que a proteína utilizada neste estudo é mais estável. Desta forma, para a realização de um ensaio em perfusão, tempos de residência de até 24 horas são aceitáveis, visto que não há perda significativa de atividade neste intervalo de tempo.

A partir dos resultados dos ensaios em *Spinner* e biorreator com a linhagem rSKHep e do conhecimento adquirido com a linhagem rHeLa, partiu-se para a definição dos parâmetros utilizados no ensaio em modo perfusão. Neste tipo de processo, de maneira simplificada, a soma das vazões específicas de alimentação das correntes de entrada (D) devem ser iguais a

soma das vazões específicas de alimentação das correntes de saída (D). O cálculo destas vazões específicas está diretamente relacionado ao tempo de residência hidráulico, isto é, o tempo que o meio leva para entrar e sair do biorreator. Neste tipo de processo, as células ficam retidas no biorreator, apenas o meio com o produto, substratos e subprodutos tóxicos saem na corrente de saída. A figura 5.51 ilustra um esquema deste tipo de processo.



Figura 5.51 - Esquema do experimento em perfusão.

O tempo de residência hidráulico definido para o Ensaio 75 (Tabela 4.7) foi de 24 horas, apesar do rFVIII ser instável à temperatura de cultivo (37 °C) e da necessidade de coletar a proteína o mais rápido possível, decidiu-se utilizar este tempo de residência, primeiramente porque, como já foi comentando, a perda de atividade neste intervalo de tempo é aceitável (ver Figura 5.50) e, principalmente, devido à indisponibilidade de soro fetal bovino no laboratório, para tempos de residência hidráulico menores.

Outro fator importante neste tipo de processo é a alimentação de substratos. Uma das principais razões para se utilizar a estratégia de alimentação de substratos é controlar a velocidade de consumo dos mesmos, a fim de se evitar a produção de subprodutos tóxicos. Como os principais substratos utilizados no metabolismo celular são glicose e glutamina, e pelo fato do metabolismo de ambos ser interdependente, decidiu-se fazer a alimentação de cada um deles separadamente, para que se pudesse controlar de forma independente a vazão de cada um, em função das respostas que fossem obtidas durante o ensaio. Foram utilizadas soluções concentradas de glicose (10 a 15 g/L) e glutamina (10 g/L) diluídas no meio base, sem adição de glicose e glutamina (Meio 1c) e uma terceira alimentação apenas de meio (Meio 1c).

As vazões dos meios contendo glicose e glutamina foram ajustadas durante todo o ensaio, de forma que as concentrações destes substratos se mantivessem baixas, em torno de 1 g/L de glicose e 300 mg/L de glutamina, no interior do biorreator. A soma das vazões específicas das três alimentações resultava na vazão específica de alimentação necessária para se ter um tempo de residência hidráulico de 24 horas. Segundo a equação:

$$D = D_{M,0} + D_{GLC,0} + D_{GLN,0}$$
(5.2)

Onde:

- D vazão específica de alimentação do ensaio (h⁻¹);
- D_{M,0} vazão específica de alimentação de meio sem adição de glicose e glutamina (h⁻¹);
- D_{GLC,0} vazão específica de alimentação de meio contendo glicose (h⁻¹);
- D_{GLN,0} vazão específica de alimentação de meio contendo glutamina (h⁻¹).

A figura 5.52 ilustra o esquema adotado no experimento. O desafio, então, era saber a vazão de alimentação de cada substrato. Foi adotado como Volume de Controle o biorreator.



Figura 5.52 - Esquema do experimento em perfusão.

O balanço de massa a seguir mostra o cálculo da vazão específica de alimentação de glicose, que foi realizado durante todo o ensaio. O cálculo para a vazão específica de alimentação de glutamina é análogo.

$$\frac{dGLC}{dt} = D_{GLC,0}.GLC_0 - D.GLC - r_{GLC} \iff (5.3)$$

$$D_{GLC,0} = \frac{D.GLC + r_{GLC} + \frac{dGLC}{dt}}{GLC_0}$$
(5.4)

Onde:

- D_{GLC,0} vazão específica de alimentação de glicose (h⁻¹);
- D vazão específica de alimentação das correntes de entrada e saída do ensaio (h⁻¹);
- GLC₀ Concentração de glicose na corrente de entrada (g_{GLC}/L);
- GLC Concentração de glicose na corrente de saída (g_{GLC}/L);
- r_{GLC} Taxa de consumo de glicose (g_{GLC}/h);
- $dGLC/dt acúmulo de glicose no sistema (g_{GLC}/L.h).$

Na equação 5.4 os valores de GLC_0 , GLC e D eram fixos. O dGLC/dt era calculado durante todo o ensaio. O cálculo da taxa de consumo de glicose foi feito através da seguinte equação:

$$r_{GLC} = \left(\frac{1}{Y_{X/GLC}} \cdot \mu_X + m_{GLC} + \frac{1}{Y_{LAC/GLC}} \cdot \mu_{LAC}\right) \cdot Xv$$
(5.5)

Onde:

- Y_{X/GLC} Fator de conversão verdadeiro de glicose a células (cel/g);
- μ_X velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹);
- m_{GLC} coeficiente de manutenção celular (g/cel.h);
- Y_{LAC/GLC} Fator de conversão verdadeiro de glicose a lactato (g_{LAC}/g_{GLC});
- μ_{LAC} Velocidade específica de consumo de lactato (g_{LAC}/cel.h);
- Xv concentração celular viável (cel/mL).

Para se obter os valores de r_{GLC} e r_{GLN} , o primeiro passo foi estabelecer os balanços de massa de glicose e glutamina no sistema de reação, que resultam nas Equações 5.6 e 5.7, respectivamente. Foram considerados os valores estequimétricos de $Y_{LAC/GLC}$ e $Y_{NH4/GLN}$ que são 1 gLAC/gGLC e 2 gNH₄/gGLN, respectivamente.

$$\mu_{GLC} = \begin{pmatrix} \frac{1}{Y_X / GLC} & \mu_X \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} m_{S,GLC} & + \mu_{LAC} \\ 1^\circ & 2^\circ \end{pmatrix}$$
(5.6)

$$\mu_{GLN} = \begin{pmatrix} 1 \\ Y_X / GLN \\ 1^\circ \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} m_{S,GLN} \\ 2^\circ \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 1 \\ 2 \\ 3^\circ \end{pmatrix}$$
(5.7)

Em ambas equações, são considerados três termos, os quais estão relacionados a diferentes caminhos metabólicos percorridos pelos substratos. O primeiro termo se refere ao consumo de substrato direcionado à produção de biomassa no sistema. O segundo, à quantidade de substrato necessário para a manutenção celular. Por fim, o terceiro termo está relacionado à produção de subprodutos (lactato para a glicose e amônia para a glutamina). A quantidade de substrato necessária para gerar o rFVIII foi desprezada por ser muito pequena.

A produção de subprodutos tóxicos foi considerada nos cálculos, mesmo que o almejado era não atingir altas concentrações destes subprodutos, uma vez que, pelo princípio da operação em perfusão, as concentrações de substratos são mantidas baixas para que o metabolismo celular reduza a produção dos subprodutos, além destes serem continuamente removidos junto com o meio condicionado que sai do biorreator. Apesar disso, considerou-se mais prudente considerar esta produção nos cálculos e, assim, superestimar o consumo dos substratos para evitar que houvesse deficiência dos mesmos, gerando uma condição de limitação.

A produção de alanina não foi considerada, pois este subproduto é originário tanto do metabolismo da glicose como da glutamina, de forma que entraria nas duas equações e tornaria o cálculo mais complexo. Como as concentrações de alanina produzidas são muito baixas e não parecem causar efeitos inibitórios ao crescimento, optou-se por eliminá-la dos cálculos por uma questão de simplificação.

Assim, a partir dos dados de crescimento celular, consumo de glicose e glutamina e produção de lactato e amônio, obtidos nos Ensaios 64 e 71 (Tabela 4.6) e Ensaio 73 (Tabela 4.7) foi possível calcular as velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de glicose (μ_{GLC}) e de glutamina (μ_{GLN}) e de produção de lactato (μ_{LAC}) e de amônio (μ_{NH4}) consideradas no balanço de massa, possibilitando o cálculo do coeficiente de manutenção celular, através do seguinte equacionamento, obtido a partir das equações 5.6 e 5.7:

$$(\mu_{GLC} - \mu_{LAC}) = \frac{1}{Y_{X/GLC}} \cdot \mu_X + m_{S,GLC}$$
(5.8)

$$(\mu_{GLN} - \frac{1}{2}\mu_{NH4}) = \frac{1}{Y_{X/GLN}} \cdot \mu_X + m_{S,GLN}$$
(5.9)

Desta forma, ao se traçar uma função de (μ_{GLC} - μ_{LAC})=f(μ_X) (Figura 5.53), obteve-se o coeficiente de manutenção celular de glicose através do coeficiente linear da reta e o inverso do fator real de conversão de glicose a células, através do coeficiente angular da reta. Esta reta só é obtida no instante logo após a interrupção da fase exponencial, quando os valores de μ_X começam a decrescer. O coeficiente de manutenção celular para glutamina foi obtido de maneira análoga.



Figura 5.53 - Gráfico utilizado para o cálculo do coeficiente de manutenção celular de glicose na condição com 3 gmic/L e meio com 10% de SFB em biorreator (Ensaio 73, Tabela 4.7).

Com todos os parâmetros definidos, foi possível calcular a vazão das soluções de cada um destes dois substratos. O $D_{M,0}$, referente ao meio de cultura sem glicose e glutamina, foi obtido através da equação 5.2.

O Ensaio 75 começou com uma batelada. Previu-se iniciar a perfusão em um instante próximo ao fim da fase exponencial de crescimento. Tomando-se como base o Ensaio 73, que apresentou 21 horas de lag e 102 horas de fase exponencial, decidiu-se começar o perfusão 72 horas após o início da fase exponencial, isto é, com aproximadamente 143 horas de ensaio. A finalidade era evitar que os subprodutos atingissem concentrações inibitórias ou que os substratos atingissem concentrações limitantes, causando o início da morte celular. A concentração de glicose (Figura 5.54c) neste ponto indica que a decisão foi correta, pois restavam apenas 0,5 g/L deste substrato no cultivo.

A retenção celular foi feita através de um *spinfilter* interno acoplado ao eixo de agitação e, consequentemente, com a mesma velocidade de rotação do impelidor. O ensaio iniciou com uma agitação de 150 rpm mas, com aproximadamente 185 horas, notou-se que os microcarregadores estavam decantando, de forma que um incremento na velocidade de agitação foi necessário e esta foi aumentada para 250 rpm.

Após 113 horas do início da perfusão e 250 horas de ensaio, a concentração celular (Figura 5.54a) atingiu um patamar, o qual se manteve em estado estacionário, por pelo menos, 4,3 tempos de residência hidráulico (\pm 104 horas), com uma média de 1,02E+06 \pm 1,42E+05 cel/mL e coeficiente de variação de 14%. Esta concentração foi aproximadamente 40% menor que a concentração máxima esperada, obtida no Ensaio 73, tido como referência para este ensaio, uma vez que a disponibilidade de área para adesão foi igual nos dois ensaios.

Existem dois fatores que podem ter influenciado esta resposta inferior de concentração celular: a) a presença do *spinfilter* no interior do biorreator deste ensaio, o qual reduziu o volume útil disponível e que, potencialmente, aumentou a incidência de choques entre os microcarregadores e, consequentemente, as forças cisalhantes no sistema e; b) o incremento da agitação de 150 para 250 rpm durante o ensaio que, também, pode ter aumentado o efeito de cisalhamento no sistema.

Apesar disso, observou-se que, ao final do ensaio, os microcarregadores estavam completamente confluentes, a tal ponto que era possível observar células fazendo pontes entre os microcarregadores (Figura 5.55).



Figura 5.54 - Resultados do ensaio em perfusão com a linhagem rSKHep no Meio 1c. (a) Crescimento celular (Xv) e viabilidade (Viab); (b) pH; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de rFVIII; e (f) Concentração de amônio. A linha vertical azul contínua representa o instante de início da perfusão e as linhas tracejadas vermelhas indicam os três tempos de residência em que o patamar se manteve. A linha horizontal preta tracejada indica a concentração de fator VIII no plasma sanguíneo de uma pessoa sadia.



Figura 5.55 - Microcarregadores com células do Ensaio 75.

Pode-se observar que, após o início da operação em perfusão, obteve-se êxito em manter a concentração de glicose constante (Figura 5.54c), exceto por um ponto, em 160,5 horas, no qual a concentração deste substrato ficou próxima de zero, devido a uma falha na bomba de alimentação, com duração de aproximadamente 6 horas. A concentração média de glicose mantida durante a fase estacionária (\pm 104 horas) foi de 0,95 \pm 0,34 g/L. Estes dados possuem um CV de 35,7%, que pode ser considerado alto, porém as justificativas são: a) o fato de que as medidas das concentrações deste substrato não eram realizadas on-line, era necessário esperar cerca de 1,5 h para saber a concentração, para então, tomar uma decisão de ajuste da vazão de alimentação; b) o número de amostras analisadas eram limitadas e c) a concentração almejada era muito baixa.

Infelizmente, as análises de glutamina não estão disponíveis. Mas o perfil estável observado na figura da concentração de amônio (Figura 5.54f) dá indícios de que a concentração deste aminoácido também se manteve constante, a média da concentração de amônio foi de $19,79 \pm 1,75 \text{ mg/L}$ (CV=8,84 %).

A concentração de lactato (Figura 5.54d) atingiu, no momento do início do perfusão, 3,4 g/L, concentração que já poderia ser potencialmente inibitória, caso o ensaio continuasse em modo batelada. Com a mudança no modo de operação, a concentração de lactato diminuiu e manteve-se com uma média de 1,42 \pm 0,43 g/L do início do perfusão até o fim do ensaio.

A comparação entre os metabolismos observados durante a fase de crescimento exponencial neste ensaio e no ensaio com a mesma condição em batelada (Ensaio 73, Tabela 4.7) mostra algumas diferenças. Devido ao menor crescimento celular, o $Y_{X/GLC}$ obtido no ensaio em batelada foi 2,26 vezes maior que o obtido no ensaio em perfusão. Os valores de $Y_{NH4/X}$ também foram distintos, de forma que o ensaio em perfusão apresentou um valor 3,8 vezes maior que o ensaio em batelada. Por outro lado, os valores de $Y_{LAC/GLC}$ foram muito parecidos, com média de 0,887 g/g (CV = 3,67%).

O perfil de produção de rFVIII (Figura 5.54e) apresentou uma queda na produção, chegando a valores próximos de zero, que pode ser explicado devido à diminuição da concentração de glicose, que ocorreu com a falha na bomba de alimentação deste substrato, limitando a produção de proteína. Consequentemente, sem haver nova produção, a diminuição do rFVIII se deve a dois motivos: 1) a contínua retirada da proteína pela corrente de saída (lavagem); 2) a constante degradação de rFVIII durante o cultivo. A partir de 217 horas de cultivo, a média foi de 1,64 \pm 0,76 UI/mL e a concentração máxima atingida foi de aproximadamente 2 UI/mL, concentração equivalente àquela atingida no ensaio em batelada.

No entanto, ao se comparar as quantidades produzidas nos ensaios em batelada e perfusão, percebe-se uma diferença significativa. No ensaio em batelada (Ensaio 73, Tabela 4.7), a quantidade máxima de rFVIII foi obtida em 100 horas de cultivo (Figura 5.49). Neste instante, a concentração de rFVIII foi de 1,97 UI/mL, portanto, para um volume de 1500 mL, a quantidade máxima produzida foi de 2.955 UI.

O cálculo da quantidade produzida no ensaio em perfusão é mais complexo. Assim, o cálculo foi realizado de forma a se levar em conta, apenas a quantidade de proteína que efetivamente foi retirada do biorreator. A equação 5.10 mostra o cálculo da quantidade de rFVIII obtida no ensaio em perfusão.

$$Q_{rFVIII} = F.\left(\sum_{i} [rFVIII]_{i} \,.\, \Delta t_{i}\right) \tag{5.10}$$

Onde:

Q_{rFVIII} – quantidade de rFVIII obtida (UI);

F – vazão da corrente de saída (62,5 mL/h para um TRH de 24 horas);

[rFVIII] – concentração de rFVIII no instante i (UI/mL);

 Δt_i – intervalo de tempo no qual rFVIII é constante (h).

Assim, a equação 5.10 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$Q_{rFVIII} = F.\left(\int_{ti}^{tf} [rFVIII]dt\right)$$
(5.11)

Onde:

ti - instante de início da perfusão (h);

tf - instante final do ensaio (h).

Para o cálculo da integral, foi utilizando o alisamento do rFVIII, o qual acreditou-se ser o perfil mais próximo do real. Esta integral foi calculada de acordo com a equação 5.12.

$$\int_{ti}^{tf} [rFVIII] dt = \sum_{ti}^{tf} \left(\left(\frac{[rFVIII]_{i+1} + [rFVIII]_i}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right)$$
(5.12)

Onde,

rFVIII_i – concentração de rFVIII no instante ti (UI/mL).

A quantidade total de rFVIII produzida durante a operação em perfusão foi de:

$$Q_{rFVIII} = 62,5.258,5 = 16.156,27 Ul$$
 (5.13)

Portanto, a quantidade de rFVIII produzida no ensaio em perfusão foi aproximadamente 5,5 vezes maior que aquela produzida no ensaio em batelada. Considerando que o ensaio em batelada demorou 100 horas para atingir sua concentração máxima e que a operação em perfusão durou 215,5 horas, pode-se calcular as produtividades destes ensaios. O cálculo da produtividade do ensaio em perfusão (Ensaio 75) está mostrado na equação 5.14, e o cálculo para o ensaio em batelada (Ensaio 73), na equação 5.15.

$$\Pi_{rFVIII/Perf} = \frac{16.156,27}{215,5} = 74,97 \ UI/h \tag{5.14}$$

$$\Pi_{rFVIII/Batelada} = \frac{2.955}{100} = 29,55 \ UI/h \tag{5.15}$$

O ensaio em perfusão apresentou uma produtividade 2,5 vezes maior que o ensaio em batelada. Além disso, deve-se destacar que a qualidade da proteína obtida no ensaio em perfusão é superior, uma vez que era retirada rapidamente do biorreator, o qual se encontrava em uma condição de temperatura adversa à estabilidade da proteína.

A partir de 215 horas, o processo passou a apresentar concentração de rFVIII superior a 1 UI/mL. É importante ressaltar que esta é a concentração de FVIII no plasma sanguíneo de uma pessoa saudável. Considerando que um ser humano adulto apresenta um volume de sangue de aproximadamente 75 mL/kg, a quantidade total de rFVIII produzida neste ensaio é o suficiente para suprir completamente as necessidades de rFVIII de três pessoas de 70 kg, caso se obtivesse um rendimento ideal de purificação de 100%.

A Figura 5.56 mostra o esquema do ensaio em perfusão no laboratório.

Apesar da alta viabilidade e concentração celular constante, o ensaio teve que ser encerrado, pois, infelizmente, o projeto dispunha de poucos recursos e a quantidade de meio de cultura e de SFB eram limitados.



Figura 5.56 - Esquema do ensaio em perfusão.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho podem ser divididas em:

- a) Conclusões sobre o cultivo com a linhagem rHeLa:
 - 1) Em um ensaio típico, com meio contendo soro, a linhagem apresentou $\mu_{X,MAX}$ de 0,028 h⁻¹ e crescimento celular (ΔX) de 1,5x10⁶ cel/mL. Com relação ao metabolismo celular, a linhagem apresentou $Y_{X/GLC}$ igual a 4x10⁸ cel/g, $Y_{LAC/GLC}$ igual a 0,725 g/g e $Y_{NH4/X}$ de 9,34x10⁻² mg/10⁶ células.
 - A linhagem foi adaptada com sucesso ao cultivo em suspensão e em meios livres de soro fetal bovino com as seguintes características: livres de proteína animal e quimicamente definidos;
 - 3) Em ensaios referência, com meio quimicamente definido e livre de soro (HyCD), a linhagem adaptada ao crescimento em suspensão apresentou, em média, valores de $\mu_{X,MAX}$ de 0,024 h⁻¹ (CV = 7,2%) e crescimento celular (ΔX) de 1,35x10⁶ cel/mL (CV = 23,1%). A linhagem apresentou valores médios de Y_{X/GLC} igual a 2,9x10⁸ cel/g (CV = 16,9%), de Y_{LAC/GLC} igual a 0,573 g/g (CV = 13,2%) e de Y_{NH4/X} de 3,68x10⁻² mg/10⁶ células (CV = 16,7%);
 - 4) O aumento da osmolalidade apresentou efeitos deletérios ao crescimento e metabolismo cujas intensidades variaram de acordo com o meio de cultura testados- DMEM com 10% de SFB (347 a 450 mOsmol/kg), HyCD (317 a 440 mOsmol/kg) e Si-ACF (319 a 426,5 mOsmol/kg). Todas as condições apresentaram queda nos valores de $Y_{X/GLC}$ e aumento nos valores de $Y_{LAC/GLC}$ e $Y_{NH4/X}$. O aumento da osmolalidade também causou queda em $\mu_{X,MAX}$ e ΔX . No entanto, esta queda foi menos acentuada nas condições com meio DMEM com soro, indicando que o soro tem efeito protetor contra os efeitos deletérios do aumento da osmolalidade;
 - 5) A adição de Pluronic F68 ao meio HyCD não apresentou mudanças significativas no crescimento ou no metabolismo celular. No entanto, o aumento da concentração de 0 para 0,2% de Pluronic causou um aumento de 70% nos valores de Y_{LAC/GLC};
 - 6) A adição de glutamina apresentou melhores resultados quando feita no meio da fase de crescimento exponencial de cultivos em frascos *Spinner*. A adição de

175 mg/L apresentou aumento de 33% no crescimento celular e redução de 15% no valor de $Y_{LAC/GLC}$. A adição de 350 mg/L, por sua vez, apresentou a menor produção de amônio com redução de 13% no valor de $Y_{NH4/X}$, quando comparada ao ensaio referência;

- A adição de serina ao cultivo durante a fase de crescimento exponencial resultou em maior crescimento celular. A cistina, por outro lado, causou diminuição no crescimento celular;
- 8) A suplementação do meio de cultura com aprotinina aumentou o crescimento e a velocidade especifica de crescimento celular em 11 e 5%, respectivamente. A albumina, por sua vez, quando adicionada reduziu estes parâmetros em 105 e 14%, respectivamente. A adição de ambos os suplementos ao meio de cultura teve efeitos similares ao da adição de apenas albumina;
- 9) Os cultivos em biorreator mostram que, sob condições controladas de pH (7,4) e pO₂ (5-50%), o crescimento e a viabilidade celular foram limitados por glicose;
- A disponibilidade de glutamina, serina e cistina não pareceram influenciar o crescimento celular em biorreatores, uma vez que o esgotamento destes aminoácidos não apresentou efeitos significativos no cultivo;
- A via da alanina aminotransferase esteve ativa quando houve excesso de glicose e glutamina no meio de cultura. O esgotamento de um destes substratos causou o aumento da produção de lactato e/ou NH4⁺;
- 12) A condição com 30% de oxigênio dissolvido apresentou crescimento e velocidade específica máxima de crescimento celular aproximadamente 20% melhor que as outras condições estudadas;
- A variação de oxigênio dissolvido no sistema causou alterações no metabolismo da glicose, evidenciadas pelas variações nos fatores de conversão de glicose a biomassa (Y_{X/GLC}) e de conversão de glicose a lactato (Y_{LAC/GLC});
- 14) Variações nas concentrações iniciais de glutamina (GLN_0) não alteraram a velocidade específica máxima de crescimento. No entanto, o aumento de GLN_0 de 175 para 700 mg/L aumentou em 4,73 vezes o crescimento celular. Por outro lado, o aumento de GLN_0 de 700 para 1050 mg/L, causou uma diminuição de 40% no crescimento;

- 15) As variações em GLN₀ causaram alterações nos metabolismos de glutamina e de glicose, evidenciados pelas mudanças nos valores de Y_{X/GLC} e Y_{LAC/GLC}, mostrando que ambos estão interrelacionados;
- 16) Quando variada entre 4 e 17 g/L, a GLC_0 não mostrou efeitos significativos em $\mu_{X,MAX}$. Entretanto, a diminuição de 2 para 4 g/L de GLC_0 resultou em uma diminuição de 35% neste parâmetro. Em contrapartida, o crescimento celular mostrou-se diretamente relacionado a GLC_0 , de forma que o aumento de 2 para 17 g/L apresentou um incremento de 11,6 vezes no crescimento celular;
- 17) Não foi possível executar o ensaio em modo perfusão, devido à fragilidade da linhagem celular, a qual apresentou uma diminuição significativa da viabilidade celular em poucas horas de experimento.
- b) Conclusões sobre o cultivo da linhagem rSKHep:
 - 1) Em um ensaio típico, com meio contendo SFB, a linhagem apresentou $\mu_{X,MAX}$ de 0,028 h⁻¹ e crescimento celular (ΔX) de 1,46x10⁶ cel/mL. Com relação ao metabolismo celular, a linhagem apresentou $Y_{X/GLC}$ igual a 3,3x10⁸ cel/g, $Y_{LAC/GLC}$ igual a 0,743 g/g e $Y_{NH4/X}$ de 2,25x10⁻² mg/10⁶ células. Com exceção deste último, esse valores foram muitos semelhantes àqueles obtidos no cultivo da linhagem rHeLa com meio com SFB. Aconcentração máxima de rFVIII obtida foi de 5,27 UI/mL;
 - Não foi possível adaptar a linhagem rSKHep ao cultivo em suspensão e a meios isentos de SFB;
 - A condição de cultivo em microcarregadores que maximizou a produção de rFVIII por célula foi: 3 cel/mic e 3 gmic/L no sistema. A condição com 1 cel/mic e 3 gmic/L apresentou crescimento celular 20% superior à segunda melhor condição com 3 cel/mic;
 - 4) O aumento do número de células por microcarregador de 1 para 8 causou uma diminuição de quase 3 vezes em Y_{X/GLC}. No entanto, Y_{LAC/GLC} não foi afetado significativamente por estas variações. O valor de Y_{NH4/X}, por sua vez, apresentou um aumento de 3,5 vezes.
 - O aumento da concentração de microcarregadores adicionados de 3 para 9 g/L provocou uma redução de 15% no crescimento celular, devido ao aumento da

frequência de choques entre as partículas. A adição de 15 g/L inibiu completamente o crescimento celular. A produção de rFVIII não foi afetada significativamente entre 3 e 9 g/L, mas sofreu uma redução de 45%, quando a concentração de microcarregadores aumentou para 15 g/L;

- 6) Os resultados de crescimento celular e de produção de rFVIII foram maximizados em cultivos com 10% de SFB, em comparação com aqueles com 5% de SFB, mostrando o efeito protetor do soro, tanto no que se refere às forças cisalhantes do sistema, como à estabilidade da proteína;
- 7) A partir dos parâmetros estabelecidos com os cultivos em biorreator com as linhagens rHeLa (pO₂) e rSKHep (relação cel/mic e gmic/L), realizou-se com sucesso o cultivo em perfusão. Foi possível manter todos os parâmetros estáveis por quatro tempos de residência;
- 8) O cultivo em perfusão permitiu a maximização da produção de rFVIII, de forma a se obter uma quantidade total de proteína 5,5 vezes superior à condição em batelada. Em termos de produtividade, o ensaio em perfusão apresentou valores 3,5 vezes superiores. Além disso, a proteína ficou menos tempos exposta às condições do cultivo, diminuindo os efeitos de degradação sobre a mesma.
- c) Conclusões dos ensaios para determinação de variáveis de operação:
 - Os melhores tempos de mistura foram obtidos com impelidores tipo *Rushton*. Fatores como posição de adição do traçador, volume de trabalho, números de impelidores e distância entre eles não apresentaram respostas uniformes e devem ser analisados caso a caso;
 - 2) Foram obtidas diversas condições de operação que maximizaram a retenção em *spinfilter* externo. Dentre as variáveis estudadas, a rotação do *spinfilter* mostrou-se crítica, apresentando depósito de partículas e, consequentemente, afetando a homogeneidade do sistema, a 400 rpm.

REFERÊNCIAS*

ABRANCHES, E.; BEKMAN, E.; HENRIQUE, D.; CABRAL, J. M. S. Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 1211-1221, 2007.

ADAMSON, R. Design and operation of recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII. **Annals of Hematology**, v. 68, p. S9-S14, 1994.

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 em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Essential cell biology**. 3rd ed. New York: Taylor & Francis, 2010.

ALOI, L. E.; CHERRY, R. S. Cellular response to agitation characterized by energy dissipation at the impeller tip. **Chemical Engineering Science**, v. 51, p. 1523-1529, 1996.

ALTAMIRANO, C.; PAREDES, C.; CAIRÓ, J. J.; GÒDIA, C. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 69-75, 2000.

ALTAMIRANO, C.; ILLANES, A.; CASABLANCAS, A.; GÁMEZ, X.; CAIRÓ, J. J.; GÒDIA, C. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1032-1041, 2001.

ALTAMIRANO, C.; PAREDES, C.; ILLANES, A.; CAIRÓ, J. J.; GÒDIA, C. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 171-179, 2004.

ALTAMIRANO, C.; ILLANES, A.; BECERRA, S.; CAIRÓ, J. J.; GODIA, F. Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 547-556, 2006.

ALTAMIRANO, C.; GODIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *in vitro*. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 81-104.

AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; BUTLER, M. Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy. London: Taylor & Francis, 2008. p. 75-110.

ANTONE, P. D. Energy metabolism in cancer cells: How to explain the Warburg and Crabtree effects? **Medical Hypotheses**, v. 79, p. 388-392, 2012;

ATANASSOV, C. L.; SEILER, N.; REBEL, G. Reduction of ammonia formation in cell cultures by L-alanyl-L-glutamine requires optimization of the dipeptide concentration. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 159-162, 1998.

^{*} De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências:

elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ATCC.Misidentifiedcelllines.Disponívelem:<http://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Misidentified_Cell_Lines.as</td>p>. Acesso em: 31 ago. 2010.

AUGUSTO, E. F. P.; LÉO, P.; SEVERO, A. C. R.; SCHMIDELL, W.; VILAÇA, P. R.; MOZER, O. D.; OLIVEIRA, M.S. A study of the influence of pH and dissolved oxygen concentration on BHK-21 cells growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 1-8, 2000.

AUGUSTO, E. F. P.; OLIVEIRA, M. S. Processos com células animais. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial.** São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3. p. 547-582.

AUGUSTO, E. F. P.; BARRAL, M. F.; PICCOLI, R. A. M. Modelos de crescimento e formação de produtos no cultivo de células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 105-119.

AVERY, M.; PLZAK, K.; GASS, J. **The production of recombinant factor VIII**. Process design – Final Report. ChemE 250A. November 25, 2003.

BARNABÉ, N.; BUTLER, M. The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma. **Cytotechnology**, v. 34, p. 47-57, 2000.

BATISTA, F. R. X.; MORAES, A. M.; BÜNTEMEYER, H.; NOLL, T. Influence of culture conditions on recombinant Drosophila melanogaster S2 cells producing rabies virus glycoprotein cultivated in serum-free medium. **Biologicals**, v. 37, p. 108-118, 2009.

BERG, T. M.; OYAAS, K.; LEVINE, D. W. Betaine will protect hybridoma cells from hyperosmotic stress. **Biotechnology Techniques**, v. 5, p. 179-182, 1991.

BERRIOS, J., DÍAZ-BARRERA, A., BAZÁN, C., ALTAMIRANO, C. Relationship between tissue plasminogen activator production and specific growth rate in Chinese Hamster Ovary cells cultured in mannose at low temperature. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1493–1497, 2009

BHATTACHARYYA, M. S.; SINGH, J.; SONI, P.; BANERJEE; U. C. Recombinant factor VIII for haemophilia. An overview of production technologies. **CRIPS**, v. 4, p. 2-8, 2003.

BIGGERS, J. D.; McGINNIS, L. K.; LAWITTS, J. A. Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation em bryos in vitro. **Reproductible medicine online**, v. 9, p. 59-69, 2004.

BIOPLAN ASSOCIATES. A study of Biotherapeutic Developers and Contract Manufacturing Organizations. In: ANNUAL REPORT AND SURVEY OF BIOPHARMACEUTICAL MANUFACTURING CAPACITY AND PRODUCTION, 9, 2012, Rockville, EUA.

BLACK, D. J.; BARFORD, J. P.; HARBOUR, C.; PACKER, N.; FLETCHER, A. Serum content affects the structure and activity of the antibody produced by animal cells in culture. In.: BEUVERY, E. C.; GRIFFITHS, J. B.; ZEIJLEMAKER, W. P. **Animal Cell Technology**: Developments Toward the 21st Century. Netherlands: Springer, 1995, p. 365-369.

BLECKWENN, N. A.; GOLDING, H.; BENTLEY, W. E.; SHILOACH, J. Evaluation of production parameters with the vaccinia virus expression system using microcarrier attached HeLa cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 554-556, 2005a.

BLECKWENN, N. A.; GOLDING, H.; BENTLEY, W. E.; SHILOACH, J. Production of recombinant proteins by vaccinia virus in a microcarrier based mammalian cell perfusion bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 663-674, 2005b.

BLÜML, G. Culture of Animal Cell (Adherent and Suspension Cells) on Microcarriers. Palestra proferida no curso "*Production of Biopharmaceuticals in Animal cell Cultures*", Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

BOEDEKER, B. G. D. The manufacturing of the recombinant factor VIII, Kogenate. **Transfusion** Medicine Reviews, v. 6, n. 4, p. 256-260, 1992.

BORYS, M. C.; LINZER, D. I. H.; PAPOUTSAKIS, E. T. Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese Hamster Ovary cells in a pH-dependent manner. **Biotechnology and Bioengineering**, 1994.

BORYS, M. C.; LINZER, D. I.; PAPOUTSAKIS, E. T. Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Biotechnology (NY)**, v. 11, p. 720-724, 1993.

BOWEN, D. J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology, v. 55, p. 1-18, 2002.

BURGENER, A.; BUTLER, M. Medium Development. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 41-79.

BUTLER, M. Animal cell culture and technology. London: BIOS, 2004.

BUTLER, M. Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 122-137.

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

CAPES-DAVIS, A.; THEODOSOPOULOS, G.; ATKIN, I.; DREXLER, H. G.; KOHARA, A.; MACLEOD, R. A. F.; MASTERS, J. R.; NAKAMURA, Y.; REDI, Y. A.; REDDEL, R. R.; FRESHNEY, R. I. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. International Journal of Cancer, v. 127, p. 1-8, 2010.

CARRONDO, M. J. T. Animal cell technology in the biopharmaceutical industry. In: INTERNATIONAL SCHOOL ON PRODUCTION OF BIOLOGICALS USING ANIMAL CELL CULTURE, 4., 2011, Rio de Janeiro. **Proceedings.** Rio de Janeiro: UFRJ, 2011.

CARSTENS, J. N.; CLARKE, H. R. G.; JENSEN, J. P. Perfusion! Jeopardy or the ultimate advantage? **Bioprocess International Webinar**, Oct 2009.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A. Processos de separação de células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 288-319.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).Universal Data Collectionprogram(UDC)datareport.2011.Disponívelem:<https://www2a.cdc.gov/ncbddd/htcweb/UDC_Report/UDC_Report.asp>.Acesso em: 10 abr. 2013.

CLINKE, M. F.; MÖLLERYD, C.; ZHANG, Y.; LINDSKOG, E.; WALSH, K.; CHOTTEAU, V. Study of a recombinant CHO cell line producing a monoclonal antibody by ATF or TFF external filter perfusion in a WAVE BioreactorTM. In. HAUSER, H. (Ed.). **Proceedings of the the 22nd ESACT Meeting**, v. 5, p. 105-107, 2011. Suppl. 8.

CHA, H. J.; SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHO, H. S.; DALAL, N. N.; PHAM, M. Q.; BENTLEY, W. E. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 225-233, 2005.

CHEN, R. Bacterial expression. Systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1102-1107, 2012.

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

CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 216-254.

CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U. J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 143-153, 2002.

CHU, L.; ROBINSON, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 180-187, 2001.

CROUGHAN, M. S. **Hydrodynamic effects on animal cells in microcarrier bioreactors**. 1988. Ph. D. thesis (Chemical Engineering) - University of California at Berkeley, California, 1988.

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

CRUZ, H. J.; FERREIRA, A. S.; FREITAS, C. M.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 579-585, 1999.

CRUZ, H. J.; FREITAS, C. M.; ALVES, P. M.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 43-52, 2000.

ÇELIK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1108-1118, 2012.

DALM, M. C. F.; JANSEN, M.; KEIJZER, T. M. P.; VAN GRUNSVEN, W. M. J.; OUDSHOORN, A.; TRAMPER, J.; MARTENS, D. E. Stable hybridoma cultivation in a pilot-scale acoustic perfusion system: Long-term process performance and effect of recirculation rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, p. 894-900, 2005.

DAVIS, K. M.; BRIGSTOCK, D. R.; JOHNSON, P. R.; CRISSMAN-COMBS, M. A.; MCCARTHY, D. W.; DOWNING, M. T.; BESNER, G. E. Production of glycosylated heparin-binding EGF-like growth factor in HeLa cells using vaccinia virus. **Protein Expression and Purification**, v. 8, p. 57-67, 1996.

DESAINTES, C.; DEMERET, C.; GOYAT, S.; YANIV, M.; THIERRY, F. Expression of papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 504-514, 1997.

DEZENGOTITA, V. M.; KIMURA, R.; MILLER, W. M. Effects of CO_2 and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. **Cytotechnology**, v. 28, p. 213-227, 1998.

DEZENGOTITA, V. M.; SCHMELZER, A .E.; MILLER, W. M. Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO2 and osmolality: Intracellular pH, cell size, apoptosis and metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 360-380, 2002.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOULET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 568-576, 2011.

DOVERSKOG, M.; LJUNGGREN, J.; ÖHMAN, L.; HÄGGSTRÖM, L. Physiology of cultured animal cells. Journal of Biotechnology, v. 59, p. 103-115, 1997.

DOWD, J. E.; WEBER, I.; RODRIGUEZ, B.; PIRET, J. M.; KWOK, K. E. Predictive controlo f hollow-fiber bioreactors for the production of monoclonal antibodies. **Biotechnology and bioengineering**, v. 63, p. 484-492, 1999.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. England: John Wiley and Sons, 1999.

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

DUCOMMUN, P.; RUFFIEUX, P. A.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. The role of vitamins and amino acids on hybridoma growth and monoclonal antibody production. **Cytotechnology**, v. 37, p. 65-73, 2001.

DUPONT.Historyofbiotechnology.Disponívelem<http://www2.dupont.com/Biotechnology/en_US/intro/history.html>. Acesso em: 30 mar. 2013.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 700-707, 2009.

DUVAL, D.; DEMANGEL, C.; MUNIERJOLAIN, K.; MIOSSEC, S.; GEAHEL, I. Factors controlling cell-proliferation and antibody-production in mouse hybridoma cells. I. Influence of the amino acid supply. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 561-570, 1991.

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

EIBL, R.; KAISER, S.; LOMBRISER, R.; EIBL, D. Disposable bioreactors: the current state-of-theart and recommended applications in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 41-49, 2010.

EL-ENSAHSY, H. A.; ABDEEN, A.; ABDEEN, S.; ELSAYED, E. A.; DEMELLAWY, M. E.; EL-SHEREEF, A. A. Serum concentration effects on the kinetics and metabolism of HeLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, p. 608-615, 2009.

ENFORS, S. O.; JAHIC, M.; ROZKOV, A.; XU, B.; HECKER, M.; JÜRGEN, B.; KRÜGER, E.; SCHWEDER, T.; HAMER, G.; O'BEIRNE, D.; NOISOMMIT-RIZZI, N.; REUSS, M.; BOONE, L.; HEWITT, C.; MCFARLANE, C.; NIENOW, A.; KOVACS, T.; TRÄGARDH, C.; FUCHS, L.; REVSTEDT, J.; FRIBERG, P. C.; HJERTAGER, B.; BLOMSTEN, G.; SKOGMAN, H.; HJORT, S.; HOEKS, F.; LIN, H. Y.; NEUBAUER, P.; VAN DER LARS, R.; LUYBEN, K.; VRABEL, P.; MANELIUS, A. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. Journal of Biotechnology, v. 85, p. 175-185, 2001.

ERIKSON, R. K.; FENGE, C.; LINDNER-OLSSON, E.; LJUNGQVIST, C.; ROSENQUIST, J.; SMEDS, A. L.; ÖSTLIN, A.; CHARLEBOIS, T.; MEONARD, M.; KELLEY, B. D.; LJUNGQVIST, A. The manufacturing process for B-Domain deleted recombinant factor VIII. **Seminars in Hematology**, v. 38, p. 24-31, 2001. Suppl. 4.

FAHRNER, R. L.; KNUDSEN, H. L.; BASEY, C. D.; GALAN, W.; FEUERHELM, D.; VANDERLAAN, M.; BLANK, G. S. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: Development, operation, and validation of chromatography processes. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 18, p. 301-327, 2001.

FATOUROS, A.; OSTERBERG, T.; MIKAELSSON, M. Recombinant factor VIII SQ – Influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 155, p. 121-131, 1997.

FAY, P. J.; ANDERSON, M. T.; CHAVIN, S. I.; MARDER, V. J. The size of human factor VIII heterodimers and the effects produced by thrombin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 371, p. 268-278, 2001.

FENG, Q.; MI, L.; LI, L.; RONG, L.; XIE, L.; TANG, H.; CHEN, Z. Application of "oxygen uptake rate-amino acids" associated mode in controlled-fed perfusion culture. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 422-430, 2006.

FENGE, C.; KLEIN, C.; HEUER, C.; SIEGEL, U.; FRAUNE, E. Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. **Cytotechnology**, v. 11, p. 233-244, 1993.

FENGE, C.; LÜLLAU, E. Cell culture bioreactors. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 155-224.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 416-421, 2010.

FERRER-MIRALLES, N., DOMINGO-ESPÍN, J., CORCHERO, J. L., VÁZQUEZ, E., VILLAVERDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 1-8, 2009.

FIGUEREDO-CARDERO, A. Filtros de malha rotativa internos e externos como dispositivos de retenção de células animais: um estudo com o auxílio de velocimetria por imagem de partículas e fluidodinâmica computacional. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

FISCHER, A. C.; HAITJEMA, C. H.; GUARINO, C.; CELIK, E.; ENDICOTT, C. E.; READING, C. A.; MERRITT, J. H.; PTAK, A. C.; ZHANG, S.; DELISA, M. P.Production of secretory and extracellular N-linked glycoproteins in *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 871-881, 2011.

FITZPATRICK, L.; JENKINS, H. A.; BUTLER, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, p. 93-116, 1993.

FLIEDL, L.; KAISERMAYER, C. Transient gene expression in HEK293 and vero cells immobilized on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 15-21, 2011.

FOUNTOULAKIS, M.; TSANGARIS, G.; OH, J.; MARIS, A.; LUBEC, G. Protein progile of the HeLa cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 247-265, 2004.

FRANCHINI, M.; TAGLIAFERRI, A.; MENGOLI, C.; CRUCIANI, M. Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemophilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates: A critical systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 81, p. 82-93, 2012.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 34, p. 229-237, 2001.

FRAZZATI-GALLINA, N. M.; PAOLI, R. L.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; JORGE, S. A. C.; PEREIRA, C.A. High production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 67-72, 2001.

FRAZZATI-GALLINA, N. M.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; PAOLI, R. M.; SILVA, M. L.; MIYAKI, C.; VALENTINI, E. J.; RAW, I.; HIGASHI, H. C. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, v. 23, p. 511-517, 2004.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5. ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2005.

GAMBHIR, A.; ZHANG, C.; EUROPA, A.; HU, W. S. Analysis of the use of fortified medium in continuous culture of mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 31, p. 243-254, 1999.

GAWLITZEK, M.; RYLL, T.; LOFGREN, J.; SLIWKOWSKI, M. B. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. **Biotechnology** and **Bioengineering**, v. 68, p. 637-646, 2000.

GAWLITZEK, M.; VALLEY, U.; NIMTZ, M.; WAGNER, R.; CONRADT, H. S. Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 42, p. 117, 131, 1995.

GE HEALTHCARE. Microcarrier cell culture. Principles and Methods, 2005.

GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Cell Metabolism. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 81-112.

GOMPERTS, E.; LUNDBLAD, R.; ADAMSON, R. The manufacturing process of recombinant factor VIII, Recombinate. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 247-251, 1992.

GORJÃO, R. Contagem de células. In. CURI, R.; PERES, C. M. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 22-24.

GOUDAR, C.; BIENER, R.; BOISART, C.; HEIDEMANN, R.; PIRET, J.; DE GRAAF, A.; KONSTANTINOV, K. Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite

balancing and 2D [¹³C, ¹H] COSY NMR spectroscopy. Metabolic Engineering, v. 12, p. 138-129, 2010.

GUH, S.; GROSSE, S. D.; MCALLISTER, S.; KESSLER, C. M.; SOUCIE, J. M. Costs of care for privately insured males with hemophilia in the Unites States. Abstracts of the Hemostasis & Thrombosis Research Society, 2011 Annual Scientific Symposium, April 28-30, Northwestern Memorial Hospital, Chicago, IL. **Haemophilia**, v. 17, p. 566, 2011

HACKER, D. L., DE JESUS, M., WURM, F. M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – Where do we go from here ? **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 1023-1027, 2009.

HAGGSTRÖM, L.; LJUNGGREN, J.; OHMAN, L. Metabolic engineering of animal cells. Ann. NY Acad. Sci., v. 782, p. 40-52, 1996.

HARCUM, S. W. Protein Glycosylation. In: OZTURK, S. S.; JU, W. S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 113-153.

HASSELL, T.; GLEAVE, S.; BUTLER, M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 29-41, 1991.

HAYASHI, I.; SATO, G. H. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. **Nature**, v. 259, p. 132-134, 1976.

HAYTER; P. M.; CURLING, E. M.; BAINES, A. J.; JENKINS, N.; SALMON, I.; STRANGE, P. G.; TONG, J. M.; BULL, A. T. Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-gamma. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 327-335, 1992.

HAYTER, P. M.; CURLING, E. M.; GOULD, M. L.; BAINES, A. J.; JENKINS, N.; SALMON, I.; STRANGE, P. G.; BULL, A. T. The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 1077-1085, 1993.

HENDRICK, V.; SOUZA, D. R.; PEDREGAL, A. R. S.; BASSENS, C.; RIGAUX, P.; SATO, K.; KOTARSKY, K.; WERENNE, J. Expression of recombinant protein in CHO and HeLa cells and its follow-up using EGF reporter gene. In: IIJIMA, S.; NISHIJIMA, K. I. **Animal cell technology**: basic & applied aspects. Netherlands: Springer, 2006. p. 55-59.

HENRY, O.; PERRIER, M.; KAMEN, A. Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. **Metabolic Engineering**, v. 7, p. 467-476, 2005.

HEPCENTRO.Avaliaçãohepáticainicial.Disponívelem:<http://www.hepcentro.com.br/avaliacaohepaticainicial.htm>.Acesso em: 05 abr. 2013.

HERLITSCHKA S. E.; SCHLOKAT, U.; FALKNER, F. G.; DORNER F. High expression of a Bdomain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 165-173, 1998.

HUFFORD, K. Comparison of the growth and monoclonal antibody production of suspended mammalian cells in three perfusion systems. Masters thesis (Biological Engineering) - Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, 2007.

INFOMÉDICA. **Coagulação Sanguínea**. Disponível em: http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Coagula%C3%A7%C3%A3o_Sangu%C3%ADnea. Acesso em: 05 abr. 2013.

JAN, D. C. H.; PETCH, D. A.; HUZEL, N.; BUTLER, M. The effect of dissolved oxygen on a metabolic profile of a murine hybridoma grown in serum-free medium in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, p. 153-164, 1997.

JARDON, M. A.; SATTHA, B.; BRAASCH, K.; LEUNG, A. O.; CÔTÉ, H.C.F.; BUTLER, M.; GORSKI, S. M.; PIRET, J. M. Inhibition of glutamine-dependent autophagy increases t-PA production in CHO cell fed-batch processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1228-1238, 2012.

JENKINS, N.; CURLING, E. M. A. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 354-364, 1994.

JENTOFT, N. Why are proteins O-glycosylated ? **Trends in Biochemistry Science**, v. 15, p. 291-294, 1990.

JEONG, Y. H.; WANG, S. S. Role of glutamine in hybridoma cell culture: effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 47-55, 1995.

JIANG, R.; MONROE, T.; MCROGERS, R.; LARSON, J. Manufacturing challenges in the commercial production of recombinant coagulation factor VIII. **Haemophilia**, v. 8, p.1-5, 2002. Supplement s2

KARLMAN, M.; HOLMSTRÖM, M.; WIMAN, B. A new method measuring the interaction between von Willebrand factor and coagulation factor VIII. **Thrombosis Research**, v. 127, p. 47-50, 2011.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; DORNER, A. J. Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemisty**, v. 263, p. 6352-6362, 1988.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; DAVIES, M. V.; WISE, R. J.; ISRAEL, D. I.; DOMER, A. J. Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in Chinese Hamster Ovary cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 1233-1242, 1989.

KIMURA, R.; MILLER, W. M. Effects of elevated pCO2 and/or osmolality on the growth of recombinant tPA production of CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 152-160, 1996.

KIRSCH, P.; HAFNER, M.; ZENTGRAF, H.; SCHILLING, L. Time course of fluorescence intensity and protein expression in HeLa cells stably transfected with hrGFP. **Molecules and Cells**, v. 15, p. 341-348, 2003.

KNIBBS, R. N.; DAME, M.; ALLEN, M. R.; DING, Y.; HILLEGAS, W. J.; VARANI, J.; STOOLMAN, L. M. Sustained high-yield production of recombinant proteins in transiently transfected COS-7 cells grown on trimethylamine-coated (hillex) microcarrier beads. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 9-13, 2003.

KOLIND, M. P.; NORBY, P. L.; BERCHTOLD, M. W.; JOHNSEN, L. B. Optimisation of the factor VIII yield in mammalian cell cultures by reducing the membrane bound fraction. **Journal of Biotechnology**, v. 151, p. 357-362, 2011.

KONSTANTINOV, K. Development of processes for manufacturing of therapeutic proteins In: INTERNATIONAL SCHOOL ON PRODUCTION OF BIOLOGICALS USING ANIMAL CELL CULTURE, 3., 2008, Rio de Janeiro. **Proceedings**: UFRJ, 2008.

KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS, E. T. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 476-483, 1990a.

KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS, E. T. The protective effect of serum agains hydrodynamic damage of hybridoma cells in agitated and surface-aerated bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 57-70, 1990b,

KUNKEL, J. P.; JAN, D. C.; JAMIESON, J. C.; BUTLER, M. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 55-71, 1998.

KURANO, N.; LEIST, C.; MESSI, F.; KURANO, S.; FIECHTER, A. Growth behavior of chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. effects of physical and chemical environments. **Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 101-112, 1990.

KYUNG, Y. S.; HU, W. S. Enhanced productivity of protein C by recombinant human cells in automated fed-batch cultures. **Cytotechnology**, v. 17, p. 109-115, 1995.

LACROIX-DESMAZES, S.; NAVARRETE, A. M.; ANDRÉ, S.; BAYRY, J.; KAVERI, S. V.; DASGUPTA, S. Dynamics of fator VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. **Blood**, v. 112, p. 240-249, 2008.

LANTIERI, V. S. **Cultivo de célula ST em microcarregadores, em sistema de spinner e de biorreator bubble-free**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LAO, M. S.; TOTH, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese Hamster Ovary cell culture. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 688-691, 1997.

LeFLOCH, F.; TESSIER, B.; CHENUET, S.; GUILLAUME, J. M.; CANS, P.; GOERGEN, J. L.; MARC, A. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. **Cytotechnology**, v. 52, p. 39-53, 2006.

LENAS, P.; KITADE, T.; WATANABE, H.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Adaptive fuzzy controlo f nutrientes concentration in fed-batch culture of mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 25, p. 9-15, 1997.

LENTING, P. J.; VAN MOURIK, J.A.; MERTENS, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v. 92, p. 3983-3996, 1998.

LÉO, P.; GALESI, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, A. M. Células animais: Conceitos básicos. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 15-41.

LIN, A. A.; KIMURA, R.; MILLER, W. M. Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 339-350, 1993.

LINK, T.; BÄCKSTRÖM, M.; GRAHAM, R.; ESSERS, R.; ZÖRNER, K.; GÄTGENS, J.; BURCHELL, J.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; HANSSON, G. C.; NOLL, T. Bioprocess

development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 51-62, 2004.

LJUNGREEN, J; HÄGGSTRÖM, L. Glutamine limited fed-batch culture reduces ammonium ion production in animal cells. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 705-710, 1990.

LOLLAR, P.; PARKER, C. G.; TRACY, R. P. Molecular characterization of commercial porcine factor VIII concentrate. **Blood**, v. 71, p. 137-143, 1988.

LU, S.; SUN, X.; ZHANG, Y. Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1917-1921, 2005.

LUAN, Y. T.; MUTHARASAN, R.; MAGEE, W. E. Strategies to extend longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 691-696, 1987.

LUSHER, J. M.; SCHARRER, I. Evolution of recombinant factor VIII safety: KOGENATE[®] and Kogenate® FS/BAYER. International Journal of Hematology, v. 90, p. 446-454, 2009.

MA, N.; MOLLET, M.; CHALMERS, J. J. Aeration, mixing and hydrodynamics in bioreactors. In: OZTURK, S.S.; HU, W.S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 225-248.

MANCO-JOHNSON, M. J.; ABSHIRE, T. C.; SHAPIRO, A. D.; RISKE, B.; HACKER, M. R.; KILCOYNE, R.; INGREM, J. D.; MANCO-JOHNSON, M. L.; FUNK, S.; JACONSON, L.; VALENTINO, L. A.; HOOTS, W. K.; BUCHANAN, G. R.; DIMICHELE, D.; RECHT, M.; BROWN, D.; LEISSINGER, C.; BLEAK, S.; COHEN, A.; MATHEW, P.; MATSUNAGA, A.; MEDEIROS, D.; NUGENT, D.; THOMAS, G.A.; THOMPSON, A. A., MCREDMOND, K.; SOUCIE, J. M.; AUSTIN, H.; EVATT, B. L. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 535–544, 2007.

MASTERS, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. Nature, v. 2, p. 315-319, 2002.

McMURRAY-BEAULIEU, V.; HISIGER, S.; DURAND, C.; PERRIER, M.; JOLICOEUR, M. Nabutyrate sustains energetic states of metabolism and t-PA productivity of CHO cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, p. 160-167, 2009.

MEI, B.; CHEN, Y.; CHEN, J.; PAN, C. Q.; MURPHY, J.E. Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11. **Molecular Biotechnology**, v. 34, p. 165-178, 2006.

MEIER, S. J.; HATTON, T. A.; WANG, D. I. C. Cell death from bursting bubbles: role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p. 468-478, 1999.

MEHTA, A.; TSE, L. M.; FOGLE, J.; LEN, A.; SHRESTHA, R.; FONTES, N.; LEBRETON, B.; WOLK, B.; VAN REIS, R. Purifying monoclonal antibodies. **Chemical Engineering Progress**, v. 104, p. S14-S20, 2008.

MIAO, H. Z.; SIRACHAINAN, N.; PALMER, L.; JUCAB, P.; CUNNINGHAM, M.A.; KAUFMAN, R.J.; PIPE, S.W. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. **Blood Journal**, v. 103, p. 3412-3419, 2004.

MICHELETTI, M.; BARRETT, T.; DOIG, S. D.; BAGANZ, F.; LEVY, M. S.; WOODLEY, J. M.; LYE, G. J. Fluid mixing in shaken bioreactors: Implications for scale-up predicitions from microliter-scale microbial and mammalian cell cultures. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 2939-2949, 2006.

MILLER, W. M.; WILKE, C. R.; BLANCH, H. W. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma cell growth and metabolism in continuous culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 132, p. 524-530, 1987.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hemofilia congênita e inibidor:** manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos. Brasília/DF, 2009.

MIRRO, R.; VOLL, K. Which impeller is right for your cell line? **BioProcess International**, v. 7, p. 52-57, 2009.

MIZRAHI, A. Oxygen in human lymphoblastoid cell line cultures and effect of polymers in agitated and aerated cultures. **Developments in Biological Standardization**, v. 55, p. 93.102, 1984.

MORAES, A. M. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 105-121.

MORAES, A. M. M.; JORGE, S. A. C.; ASTRAY, R. M.; SUAZO, C. A. T.; RIQUELME, C. E. C.; AUGUSTO, E. F. P.; TONSO, A.; PAMBOUKIAN, M. M.; PICCOLI, R. A. M.; BARRAL, M. F.; PEREIRA, C. A. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 613-628, 2012.

MUSCHEL, R. J.; ZHANG, H. B.; ILIAKIS, G.; MCKENNA, W. G. Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation, **Cancer Research**, v. 51, p. 5113-5117, 1991.

MUKHOPADHYAY, A.; MUKHOPADHYAY, S. N.; TALWAR, G. P. Influence of serum proteins on the kinetics of attachment of vero cells to cytodex microcarriers. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 369-374, 1993.

MURHAMMER, D. W.; GOOCHEE, C. F. Sparged animal cell bioreactors: Mechanism of cell damage and Pluronic F68 protection. **Biotechnology Progress**, v. 6, p. 391-397, 1990.

MUTHING, J.; KEMMINER, S. E.; CONRADT, H. S.; SAGI, D.; NIMTZ, M.; KARST, U.; PETER-KATALINIC, J. Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, p. 321-334, 2003.

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

NI, Y.; CHEN, R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. **Biotechnology** Letters, v. 31, p. 1661-1670, 2009.

NISHIKAWA, M.; HUANG, L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. **Human Gene Therapy**, v. 12, p. 861-870, 2001.

NIVITCHANYONG, T.; MARTINEZ, A.; ISHAQUE, A.; MURPHY, J. E.; KONSTANTINOV, K.; BETENBAUGH, M. J.; THRIFT, J. 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. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 825-841, 2007.

OGAWA, T.; KAMIHIRA, M.; YOSHIDA, H.; IIJIMA, S.; KOBAYASHI, T. Effect of dissolved oxygen concentration on monoclonal antibody production in hybridoma cell cultures. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, p. 372-378, 1992.

OLEJNIK, A.; GRAJEK, W.; MARECIK, R. Effect of hyperosmolarity on recombinant protein productivity in baculavirus expression system. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 291-300, 2003.

OZTURK, S. S. Cell culture technology – An overview. In: OZTURK, S.S.; HU, W.S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 1-13.

OZTURK S. S.; PALSSON, B. O. Effect of initial density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. **Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 259-278, 1990.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 35-46, 1991a.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 989-993, 1991b.

OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON, B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 418-431, 1992.

PAPOUTSAKIS, E. T. From CHO-cell to Stem-cell biotechnology: Oxygenation, and mixing in animal-cell culture: Bioreactors, bubbles and cell injury. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 977-979, 2009.

PÉREZ-GOMEZ, F.; BOVER, R. The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage. **Revista Española de Cardiologia**, v. 60, p. 1217-1219, 2007.

PETCH, D.; BUTLER, M. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: Glucose and glutamine utilization. Journal of Cellular Physiology, v. 161, p. 71-76, 1994.

PHILLIPS, B. W.; HORNE, R.; LAY, T. S.; RUST, W. L.; TECH, T.T.; CROOK, J.M. Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 138, p. 24-32, 2008.

PICANÇO, V. P.; COVAS, D. T.; BECKER, S.; TONN, T. Produção de FVIII por engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 81-83, 2004.

PICANÇO, V.; HEINZ, S.; BOTT, D.; BEHRMANN, M.; COVAS, D. T.; SEIFRIED, E.; TONN, T. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy**, v. 9, p. 785-794, 2007.

PIPE, S. W. Recombinant clotting factor. Thrombosis and Haemostasis, v. 99, p. 840-850, 2008.

RAMIREZ, O. Princípios e aplicações del sistema de expressión de células de insecto-baculovírus. In: **Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Culture**, CBAA Course, Rio de Janeiro, R.J., Brasil, jul. 2004.

REITZER, L. J.; WICE, B. M.; KENNELL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 8, p. 2669-2676, 1979.

REITZER, L. J.; WICE, B.M.; KENNELL, D. The pentose cycle: control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 5616-5626, 1980.

RESENDE, M. A. A.; SILVA, E. V. Administração de fatores de coagulação: quais as evidências? **Medicina Perioperatória**, v. 42, p. 335-341, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita Editora, 2005.

RODRÍGUEZ, G.; ARIAS, M. A.; SUAREZ, J.; CHEA, M.; BOUZÓ, L.; CUERVO, R.; ALVAREZ, I.; CHICO, E. Optimizing cultivation strategies in diferente scales of hollow fiber bioreactors. In: GÓDIA, F.; FUSSENEGGER, M. (Ed.). PROCEEDING OF THE THE 18TH ESACT MEETING, v. 2, p. 747-750, 2005.

ROSA, N. G.; SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; NETO, M. A. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; FAÇA, V. M.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1435-1443, 2012.

RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; PICANÇO-CASTRO, V.; ALVES, D. C. C.; FERNANDES, A. C.; ALMEIDA-PORADA, G.; TONN, T.; COVAS, D. T. Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation fator VIII in Sk-Hep and 293T cells. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 23-31, 2011.

SCHMELZER, A. E.; DEZENGOTITA, V. M.; MILLER, W. M. Considerations for osmolality measurementunder elevated pCO2: Comparison of vapor pressure and freezing point osmometry. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, p. 189-196, 2000.

SCHMELZER, A. E.; MILLER, W. M. Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 346-353, 2002.

SCHNEIDER, M.; REYMOND, F.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 839-847, 1995.

SEEWOSTER, T.; LEHMANN, J. Influence of targeted asparagine starvation on extra and intracellular amino acid pools of cultivated Chinese Hamster Ovary cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 344-350, 1995.

SELVARAJ, S. R.; SCHELLER, A. N.; MIAO, H. Z.; KAUFMAN, R. J.; PIPE, S. W. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, p. 107-115, 2011.

SEN, S.; ROYCHOUDHURY, P. K. Development of optimal medium for production of commercially important monoclonal antibody 520C9 by hybridoma cell. **Cytotechnology**, v. 65, p. 233-252, 2013.

SETHURAMAN, N.; STADHEIM, T. A. Challenges in therapeutic glycoprotein production. Current opinion in biotechnology, v. 17, p. 341-346, 2006.

SHUKLA, A. A.; GOTTSCHALK, U. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. **Trends in biotechnology**, v. 31, p. 147-154, 2013.

SINACORE, M. S.; DRAUPEAU, D.; ADAMSON, S. R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. In: JENKINS, N. (Ed.). **Methods in biotechnology**. Nova Jersey: Humana Press, 2000. v. 8, p. 11-22.

SOUKHAREV, S.; HAMMOND, D.; ANANYEVA, N. M.; ANDERSON, J. A. M.; HAUSER, C. A. E.; PIPE, S.; SAENKO, E. L. Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 28, n. 2, p. 234-248, 2002.

SPENCER, H. T.; DENNING, G.; GAUTNEY, R. E.; DROPULIC, B.; ROY, A.J.; BARANYI, L.; GANGADHARAN, B.; PARKER, E. T.; LOLLAR, P.; DOERING, C. B. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. **Molecular Therapy**, v. 19, p. 302-309, 2011.

STONEBRAKER, S. A.; BROOKER, M.; AMAND, R. E.; FARRUGIA, A.; SRIVASTAVA, A. A study of reported factor VIII use around the world. **Haemophilia**, v. 16, p. 33-46, 2010.

STORZ, U. The Cabilly patents. mAbs, v. 4, p. 274-280, 2012.

STREET, J. C.; DELORT, A. M.; BRADDOCK, P. S. H.; BRINDLE, K. M. A ¹H/¹⁵N n.m.r. study of nitrogen metabolism in cultured mammalian cells. **Biochemistry Journal**, v. 291, p. 485-492, 1993.

SUN, X.; ZHANG, Y. Glutamine cannot support recombinant CHO cell growth and maintenance in the absence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 717-720, 2004.

SUNG, Y. H.; SONG, Y. J.; LIM, S. W.; CHUNG, J. Y.; LEE, G. M. Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneicity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese Hamster Ovary cells. **Journal of Biotechnology**, v. 112, p. 323-335, 2004.

SUNLEY, K.; THARMALINGAM, T.; BUTLER, M. CHO cells adapted to hypothermic growth produce high yields of recombinant β -interferon. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 898-906, 2008.

SWIECH, K.; KAMEN, A.; ANSORGE, S.; DUROCHER, Y.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; NETO, M. S. A.; COVAS, D. T. Transient transfection of serum-free suspension HEK293 cell culture for efficient production of human FVIII. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 114-124, 2011.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expression and Purification**, v. 84, p. 147-153, 2012.

TAGLIAVACCA; L.; WANG, Q.; KAUFMAN, R. J. ATP- dependent dissociation of non-sulfidelinked aggregates of coagulation factor VIII is a rate- limiting step for secretion. **Biochemistry**, v. 39, p. 1973-1981, 2000.

TAKAGI, M.; MORIYAMA, T.; YOSHIDA, T. Effects of shifts up and down in osmotic pressure on production of tissue plasminogen activator by Chinese Hamster Ovary cells in suspension. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, v. 91, p. 509-514, 2001.

TASHIRO, S.; TSUMOTO, K.; SANO, E. Establishment of a microcarrier culture system with serial sub-cultivation for functionally active human endothelial cells. **Journal of Biotechnology**, v. 160, p. 202-213, 2012.

TONN, T.; HERDER, C.; BECKER, S.; SEIFRIED, E.; GREZ, M. Generation and characterization of human hematopoietic cell lines expressing human factor VIII. **Journal of Hematotherapy & stem Cell Research**, v. 11, p. 695-704, 2002.

TOP1000BIO. Atualização de 14/1/2013. Disponível em http://www.top1000bio.com/. Acesso em: 18 abr. 2013.

TRABELSI, K.; ROUROU, S.; LOUKIL, H.; MAJOUL, S.; KALLEL, H. Comparison of various culture modes for the production of rabies virus by Vero cells grown on microcarriers in a 2-1 bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 514-519, 2005.

TRILL, J. J.; SHATZMAN, A. R.; GANGULY, S. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 553-560, 1995.

TSAO, Y. S.; CARDOSO, A. G.; CONDON, R. G. G.; VOLOCH, M.; LIO, P.; LAGOS, J. C.; KEARNS, B. G.; LIU, Z. Monitoring Chinese Hamster Ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 316-327, 2005.

VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; FEX SVENNINGSEN, A.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L. E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M. L.; GSTRAUNTHALER, G. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro**, v. 24, p. 1053-1063, 2010.

VAN DER VELDEN-DE GROOT, C. A. M. Microcarrier technology, present status and perspective. **Cytotechnology**, v. 18, p. 51-56, 1995.

VAN WEZEL. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. **Nature**, v. 216, p. 64-66, 1967.

VERMA, A. S.; AGRAHARI, S.; RASTOGI, S.; SINGH, A. Biotechnology in the realm of history. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, p. 321-323, 2011

VERMASVUORI, R.; KOSHINEN, J.; SALONEN, K.; SIRÉN, N.; WEEGAR, J.; DAHLBACKA, J.; KALKKINEN, N.; VON WEYMARN, N. Production of recombinant HIV-1 Nef protein using different expression host systems: A techno-economical comparison. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 95-102, 2009.

VOIGT, A.; ZINTL, F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 68, p. 213-226, 1999.

VOISARD, D.; MEUWLY, F.; RUFFIEUX, P. A.; BAER, G.; KADOURI, A. Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. **Biotechnology and Bionegineering**, v. 82, p. 751-765, 2003.

VRIEZEN, N.; ROMEIN, B.; LUYBEN, K. C. A. M.; VAN DIJKEN, J. P. Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, p. 272-286, 1997.

WACKER, M.; LINTON, D.; HITCHEN, P. G.; NITA-LAZAR, M.; HASLAM, S. M.; NORTH, S. J.; PANICO, M.; MORRIS, H. R.; DELL, A.; WREN, B. W.; AEBI, M. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer to *E. coli*. **Science**, v. 298, p. 1790-1793, 2002.

WALSH, G. Bipharmaceutical benchmarks 2010. Nature Biotechnology, v. 28, p. 917-924, 2010.

WANG, W.; WANG, Y. J.; KELNER, D. N. Coagulation factor VIII: structure and stability. International Journal of Pharmaceutics, v. 259, p. 1-15, 2003.

WANG, Y.; OUYANG, F. Recycle of cytodex 3 in vero cell culture. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 207-210, 1999.

WHITE, G. C.; PICKENS, E. M.; LILES, D. K.; ROBERTS, H. R. Mammalian recombinant coagulation proteins: Structure and function. **Transfusion Science**, v. 19, p. 177-189, 1998.

WILKENS, C. A.; ALTAMIRANO, C.; GERDTZEN, Z. P. Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 714-724, 2011.

WILSON, G.; KNUDSEN, I. M. NOVO NORDISK, INC. Industrial-scale serum-free production of recombinant factor VII in mammalian cells. US 20090263866A1. 01 Jul 2009, 22 Out 2009.

WU, J. Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 81-94, 1995.

WU, S. C. Influence of hydrodynamic shear stress on microcarrier-attached cell growth: Cell line dependency and surfactant protection. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 201-206, 1999.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1393-1398, 2004.

XING, Z.; BRIAN, M. K.; LI, Z. J.; LEE, S. S. Scale-up analysis for CHO cell culture process in large-scale bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, p. 733-746, 2009.

YANG, M; BUTLER, M. Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 751-759, 2000.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 335-347, 2007.

ZAGARI, F.; JORDAN, M.; STETTLER, M.; BROLY, H.; WURM, F. M. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. **New Biotechnology**, v. 30, p. 238-245, 2013.

ZHANG, S.; HANDA-CORRIGAN, A.; SPIER, R. E. Foaming and media surfactant effects on the cultivation of animal cells in stirred and sparged bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 289-306, 1992.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1158-1170, 2012.

ZHU, M. M.; GOYAL, A.; RANK, D. L.; GUPTA, S. K. Effects of elevated pCO2 and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: A case study. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 70-77, 2005.

A) Frasco T



Figura A.1 - Resultados do Ensaio 2 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a, em frasco T. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH e Confluência; e (c) Concentrações de glicose e lactato.



Figura A.2 - Resultados do Ensaio 3 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a, em frasco T. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH e Confluência; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.3 - Resultados do Ensaio 4 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a, em frasco T. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH e Confluência; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.4 - Resultados do Ensaio 5 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a, em frasco T. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH e Confluência; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.5 - Resultados do Ensaio 6 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a, em frasco T. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH e Confluência; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.6 - Resultados do Ensaio 7 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a, em frasco T. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento celular (azul contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH e Confluência; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.7 - Resultados do Ensaio 8 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLa, com o Meio 1a, em frasco T. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento celular (azul contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH e Confluência; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.

B) Frasco Spinner



Figura A.8 - Resultado do crescimento celular (Xv) e viabilidade celular (Viab.) do Ensaio 9 (Tabela 4.1), com a linhagem rHeLaDMEMSp, Meio 1a. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial celular (azul contínua) e o fim do crescimento e início da morte celular (vermelha contínua).



Figura A.9 - Resultados do Ensaio 11 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHySFSp, com o Meio 9, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento e o fim do crescimento celular (azul contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.10 - Resultados do Ensaio 12 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. A linha vertical indica o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.11 - Resultados do Ensaio 13 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. A linha vertical indica o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.12 - Resultados do Ensaio 14 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. A linha vertical indica o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.13 - Resultados do Ensaio 15 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.14 - Resultados do Ensaio 16 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento e o fim do crescimento celular (azul contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.15 - Resultados do Ensaio 17 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. A linha vertical indica o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.16 - Resultados do Ensaio 18 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento e o fim do crescimento celular (azul contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.17 - Resultados do Ensaio 19 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua) e o fim do crescimento e início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.18 - Resultados do Ensaio 20 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua) e o fim do crescimento e início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.19 - Resultados do Ensaio 21 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua) e o fim do crescimento e início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.20 - Resultados do Ensaio 22 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaSiACFSp, com o Meio 4, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.21 - Resultados do Ensaio 23 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.22 - Resultados do Ensaio 24 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.23 - Resultados do Ensaio 25 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.24 - Resultados do Ensaio 26 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.25 - Resultados do Ensaio 27 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.26 - Resultados do Ensaio 29 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.27 - Resultados do Ensaio 30 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.28 - Resultados do Ensaio 31 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.29 - Resultados do Ensaio 32 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.30 - Resultados do Ensaio 33 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.31 - Resultados do Ensaio 34 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento (vemelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.32 - Resultados do Ensaio 35 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.33 - Resultados do Ensaio 36 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.34 - Resultados do Ensaio 37 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.35 - Resultados do Ensaio 38 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.36 - Resultados do Ensaio 39 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.37 - Resultados do Ensaio 40 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em Spinner. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentrações de glutamina e amônio.



Figura A.38 - Resultados do Ensaio 41 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de glutamina.



Figura A.39 - Resultados do Ensaio 42 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; e (b) pH.



Figura A.40 - Resultados do Ensaio 43 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; e (b) pH.



Figura A.41 - Resultados do Ensaio 44 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; e (b) pH.



Figura A.42 - Resultados do Ensaio 45 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.43 - Resultados do Ensaio 46 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em Spinner. A linha vertical indicam o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.44 - Resultados do Ensaio 47 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.45 - Resultados do Ensaio 48 (Tabela 4.3), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.

C) Biorreator



Figura A.46 - Resultados do Ensaio 51 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em biorreator. A linha vertical indica o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.47 - Resultados do Ensaio 52 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em biorreator. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.48 - Resultados do Ensaio 53 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em biorreator. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.49 - Resultados do Ensaio 54 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6b, em biorreator. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.50 - Resultados do Ensaio 55 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em biorreator. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.51 - Resultados do Ensaio 56 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6b, em biorreator. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua) e o fim do crescimento celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.52 - Resultados do Ensaio 57 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6a, em biorreator. As linhas verticais indicam o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.53 - Resultados do Ensaio 58 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6b, em biorreator. A linha vertical indica o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura A.54 - Resultados do Ensaio 59 (Tabela 4.4), com a linhagem rHeLaHyCDSp, com o Meio 6b, em biorreator. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.

APÊNDICE B – ABORDAGEM ALTERNATIVA AOS ENSAIOS EM BIORREATOR COM A LINHAGEM rHeLaHyCDSp

B.1) Avaliação da influência do oxigênio dissolvido (pO₂)

A concentração de oxigênio dissolvido neste quadro de ensaios variou entre 5 e 50% (saturação em ar), enquanto que as concentrações de glicose (GLC) e glutamina (GLN) foram mantidas constantes. Este conjunto, que engloba os Ensaios 50 a 52 (Tabela 4.4), tem como finalidade avaliar se este substrato é limitante para o crescimento da linhagem rHeLaHyCDSp. Nestes ensaios, também foram medidos os principais subprodutos da célula, amônia e lactato (NH₄⁺ e LAC) para observar se o crescimento é inibido por alguma destas substâncias.

As figuras B.1 a B.5 mostram os resultados do Ensaio 50, considerado um ensaio típico referência. As tabelas B.1 e B.2 mostram os valores das variáveis de estado nos instantes críticos do processo (final da fase exponencial, fim do crescimento celular e início da morte celular) e os valores das grandezas cinéticas calculadas na fase exponencial de crescimento, respectivamente, para todos os ensaios realizados em biorreator com esta linhagem.

Ao final da fase exponencial, não se observa a existência de uma fase estacionária ou de uma fase de crescimento linear (Figura B.1a), ou seja, a morte celular ocorre logo após a interrupção do crescimento. A viabilidade se mantém alta durante todo o período de crescimento exponencial e, após a interrupção do mesmo, observa-se inicialmente uma diminuição gradual da viabilidade até o momento em que há a interrupção do crescimento celular, instante no qual há uma queda abrupta da viabilidade (Figura B.1a).

O final do crescimento exponencial ocorre no instante, onde ainda há disponibilidade de aproximadamente 2g/L de glicose no meio de cultura (Figuras B.1a e B.1c), o que sugere que este não é o substrato responsável pela interrupção da fase exponencial nestes ensaios.



Figura B.1 - Resultados do Ensaio 50 (Tabela 4.4), alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com 30% de oxigênio dissolvido. (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) Concentração de glutamina; e (f) Concentração de NH₄⁺. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento (azul contínua), o fim do crescimento e início da morte celular (vermelha contínua).





Figura B.2 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50, alisadas através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Concentração de: (a) Alanina; (b) Arginina; (c) Asparagina; (d) Cistina; (e) Fenilalanina; e (f) Glutamato. A linha contínua azul representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.



Figura B.3 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50, alisadas através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Concentração de: (a) Leucina; (b) Lisina; (c) Metionina; (d) Isoleucina; (e) Glicina; e (f) Histidina. A linha contínua azul representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.


Figura B.4 - Concentrações dos aminoácidos principais do Ensaio 50, alisadas através do método spline. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Concentração de: (a) Prolina; (b) Tirosina; (c) Serina; (d) Triptofano; (e) Treonina; e (f) Valina. A linha contínua azul representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.



Figura B.5 - Variáveis de estado do Ensaio 50, alisadas através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator, com condição de 30% de oxigênio dissolvido. Dados de (a) volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH; e (b) percentual de oxigênio dissolvido. A linha contínua vermelha representa o instante em que a fase exponencial de crescimento é interrompida.

Infelizmente, devido ao custo da metodologia de análise de aminoácidos, foi necessário limitar a quantidade de amostras analisadas. No entanto, é possível identificar que o instante em que o crescimento exponencial é interrompido é o mesmo instante no qual a glutamina se esgota (Figuras B.1a e B.1e), o que sugere que este aminoácido é o fator responsável pela limitação do crescimento celular. Este resultado está de acordo com Reitzer et al. (1979) que mostraram que a maior parte da energia produzida por células HeLa é proveniente da glutamina e que o metabolismo de açúcares desta linhagem é direcionado principalmente para a produção de precursores para a biossítense.

É possível observar que o esgotamento da glutamina tem efeitos sobre a viabilidade celular. No entanto, o crescimento celular ainda continua por mais algumas horas, até que o esgotamento da glicose causa a interrupção do crescimento e desencadeia a morte celular. Isto sugere que este substrato é o responsável pela manutenção da viabilidade desta linhagem celular.

Os perfis de aminoácidos reforçam esta hipótese. Observa-se que, no instante de interrupção da fase exponencial, também há o esgotamento da cistina e da serina (Figuras B.2d e B.4c, respectivamente), dois aminoácidos que, como já havia sido observado nos ensaios preliminares em frascos *Spinners*, são potencialmente limitantes para o crescimento celular. Além disso, é possível observar que, quando a concentração de glutamina atinge valores muito baixos (aproximadamente 150 mg/L), o glutamato começa a ser consumido (Figuras B.1e e B.2f), o que pode explicar a capacidade da linhagem crescer por mais algumas horas após o esgotamento da glutamina.

	Nome no Laboratório	Condições iniciais					Exponencial									
Ensaio		GLC (g/L)	GLN (mg/L)	pO ₂ (%)	Osm (mOsm/kg)	X_{θ} (cel/mL)	$t_{LAG}(h)$	$t_{EXP}(h)$	X (cel/mL)	∆X	pН	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	NH 4 (mg/L)	LAC (g/L)	
50 (REF)	BiF8_08			30		1,99E+05	0,0	93,0	2,32E+06	2,15E+06	7,30	2,62	0	51,57	2,41	
51	BiF8_10	8	700	5	270	1,95E+05	0,0	95,5	1,92E+06	1,72E+06	7,31	1,72	ND	54,31	3,44	
52	BiF8_11			50		2,13E+05	19,4	97,73	1,90E+06	1,70E+06	7,44	2,4	ND	55	1,7	
53 (REF)	BiF8_12		700	30 3	320	2,23E+05	20,5	100,3	2,13E+06	1,86E+06	7,29	2,37	ND	66,04	2,02	
54	BiF8_13	0	350			2,02E+05	0,0	77,0	1,16E+06	9,88E+05	7,37	4,83	ND	32,69	1,56	
55	BiF8_14	0	1050			2,13E+05	0,0	92,1	1,93E+06	1,75E+06	7,39	0,31	ND	96,03	5,45	
56	BiF8_19		175			2,10E+05	0,0	28,5	4,10E+05	2,00E+05	7,45	6,83	ND	18,36	0,62	
57	BiF8_15	17	700			2,20E+05	0,0	99,55	2,46E+06	2,23E+06	7,40	10,55	ND	51,8	4,96	
58	BiF8_17	4	700	30	320	1,84E+05	21,2	91,5	1,45E+06	1,26E+06	7,37	0,00	ND	99,22	2,41	
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	19,3	73,7	4,77E+05	2,76E+05	7,40	0,01	ND	58,3	1,13	

Tabela B.1 - Valores das variáveis de estado nos instantes críticos do processo.

Ensaio	37	_		Condições in	viciais		Fim do crescimento								
	Nome no Laboratório	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	pO ₂ (%)	Osm (mOsm/kg)	X ₀ (cel/mL)	$t_{FIM}(h)$	X (cel/mL)	ΔX (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	NH 4 (mg/L)	LAC (g/L)	
50 (REF)	BiF8_08			30		1,99E+05	123,0	3,73E+06	3,56E+06	7,40	0,58	0	51,69	3,47	
51	BiF8_10	8	700	5	270	1,95E+05	119,0	2,84E+06	2,63E+06	7,41	0,08	ND	58,60	4,39	
52	BiF8_11			50		2,13E+05	121,4	3,14E+06	2,94E+06	7,69	0,11	ND	56,78	2,94	
53 (REF)	BiF8_12		700		30 320	2,23E+05	123,0	3,05E+06	2,81E+06	7,41	0,27	ND	66,81	3,16	
54	BiF8_13	0	350	20		2,02E+05	142,08	2,92E+06	2,72E+06	7,33	1,19	ND	22,68	3,47	
55	BiF8_14	8	1050	30		2,13E+05	98,88	1,98E+06	1,77E+06	7,41	0,15	ND	98,35	5,59	
56	BiF8_19		175			2,10E+05	94,17	8,30E+05	6,20E+05	7,40	5,65	ND	21,69	1,35	
57	BiF8_15	17	700			2,20E+05	129,0	4,00E+06	3,76E+06	7,45	7,83	ND	44,22	7,45	
58	BiF8_17	4	700	30	30 320	1,84E+05	93,0	1,45E+06	1,26E+06	7,37	0,00	ND	99,22	2,41	
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	90,0	5,38E+05	3,37E+05	7,40	0,00	ND	71,96	0,81	

Ensaio	Nome no Laboratório	Condições iniciais					Morte								
		GLC (g/L)	GLN (mg/L)	pO ₂ (%)	Osm (mOsm/kg)	X ₀ (cel/mL)	$t_{MORTE}(h)$	X (cel/mL)	ΔX (cel/mL)	pH	GLC (g/L)	GLN (mg/L)	NH 4 (mg/L)	LAC (g/L)	
50 (REF)	BiF8_08			30		1,99E+05	123,0	3,73E+06	3,56E+06	7,40	0,58	0	51,69	3,47	
51	BiF8_10	8	700	5	270	1,95E+05	119,0	2,84E+06	2,63E+06	7,41	0,08	ND	58,60	4,39	
52	BiF8_11			50		2,13E+05	121,4	3,14E+06	2,94E+06	7,69	0,11	ND	56,78	2,94	
53 (REF)	BiF8_12		700	20 220		2,23E+05	123,0	3,05E+06	2,81E+06	7,41	0,27	ND	66,81	3,16	
54	BiF8_13	0	350		220	2,02E+05	147,0	2,79E+06	2,59E+06	7,42	0,84	ND	23,62	3,60	
55	BiF8_14	8	1050	30	320	2,13E+05	98,88	1,98E+06	1,77E+06	7,41	0,15	ND	98,35	5,59	
56	BiF8_19		175			2,10E+05	-	-	-	-	-	ND	-	-	
57	BiF8_15	17	700 700			2,20E+05	129,0	4,00E+06	3,76E+06	7,45	7,83	ND	44,22	7,45	
58	BiF8_17	4		30	320	1,84E+05	93,0	1,45E+06	1,26E+06	7,37	0,00	ND	99,22	2,41	
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	90,0	5,38E+05	3,37E+05	7,40	0,00	ND	71,96	0,81	

Ensaio	Nome no Laboratório			Condições In	niciais			$Y_{LAC/GLC}$ (g/g)	$Y_{X/GLN}$ (cel/g)	Y _{NH4/GLN} (g/g)	Y _{LAC/X} (g/cel)	Y _{NH4/X} (mg/10 ⁶ cel)	$\boldsymbol{\mu}_{XMAX}(\boldsymbol{h}^{-1})$
		GLC (g/L)	GLN (mg/L)	pO ₂ (%)	Osm (mOsm/kg)	X_0 (cel/mL)	$Y_{X/GLC}$ (cel/g)						
50 (REF)	BiF8_08		700	30	270	1,99E+05	4,02E+08	0,428	2,11E+06	1,51E+01	1,05E-09	4,00E-02	0,0311
51	BiF8_10	8		5		1,95E+05	2,67E+08	0,496	ND	ND	1,91E-09	3,82E-02	0,0251
52	BiF8_11			50		2,13E+05	3,21E+08	0,317	ND	ND	9,84E-10	4,30E-02	0,0247
53 (REF)	BiF8_12		700	20	320	2,23E+05	3,40E+08	0,385	ND	ND	1,13E-09	4,41E-02	0,0244
54	BiF8_13	0	350			2,02E+05	4,46E+08	0,65	ND	ND	1,46E-09	5,00E-02	0,0242
55	BiF8_14	0	1050	50		2,13E+05	1,84E+08	0,804	ND	ND	4,36E-09	7,01E-02	0,0250
56	BiF8_19		175			2,10E+05	3,52E+08	1,017	ND	ND	2,70E-09	3,59E-02	0,0242
57	BiF8_15	17	700		320	2,20E+05	3,16E+08	0,685	ND	ND	2,15E-09	3,62E-02	0,0269
58	BiF8_17	4	700	30		1,84E+05	1,86E+08	0,723	ND	ND	3,56E-09	6,69E-02	0,0246
59	BiF8_18	2	700			2,01E+05	8,71E+07	0,538	ND	ND	3,64E-09	1,49E-01	0,0159

Tabela B.2 - Valores das grandezas cinéticas.

Lactato e amônio são subprodutos do metabolismo de glicose e de glutamina, respectivamente (Figuras B.1c, B.1d, B.1e e B.1f). Observa-se o reconsumo de LAC após o esgotamento da GLC (Figuras B.1c e B.1d), indicando que o lactato produzido é convertido de volta a piruvato, e pode re-alimentar o TCA (ver Figura 3.9). Este fenômeno já foi observado para células de mamíferos anteriormente (OZTURK et al., 1992; ALTAMIRANO et al., 2004; TSAO et al., 2005). A concentração máxima de lactato atingida (3,46 g/L, Figura B.1c) é considerada alta e há uma boa chance dessa concentração já ser inibitória ao crescimento (OZTURK et al., 1992).

A produção de NH_4^+ está diretamente relacionada ao consumo de glutamina. Isto fica evidente no momento em que ocorre o esgotamento de glutamina, ocorre a interrupção na produção de amônio (90h, Figuras B.1e e B.1f). Esse padrão típico de produção de NH_4^+ será utilizado para inferir a disponibilidade de GLN no meio de cultivo, quando a análise de aminoácidos não estiver disponível.

As concentrações de amônio atingidas nos ensaios estão entre 50 e 60 mg/L, valores considerados altos e que também podem exercer efeitos inibitórios ao crescimento celular (Figuras B.1a e B.1f). Hassell et al. (1991) já documentaram que células HeLa tem baixa tolerância ao amônio e sofrem efeitos adversos ao crescimento, quando a concentração deste subproduto chega a 13,6 mg/L. Neste trabalho não se observou que a intolerância fosse tão baixa, uma vez que o crescimento celular não foi perturbado, quando a concentração de amônio atingiu este nível, no entanto deve-se considerar que estes ensaios foram realizados em uma condição muito mais controlada de oxigênio e, principalmente, de pH, que é a principal variável afetada pela a produção de amônio.

A síntese de alanina é um recurso metabólico que células animais dispõem como forma de drenar subprodutos tóxicos do interior das células, através da via da alanina aminotransferase (AlaTA, Figura 3.10), piruvato e glutamato são convertidos em alanina, diminuindo a produção de lactato e amônio (AMABLE e BUTLER, 2008; DOVERSKOG et al., 1997). Neste ensaio, há certamente excesso de glicose, no entanto, a glutamina se esgota rapidamente. Assim, enquanto há glutamina disponível no meio de cultura, o metabolismo celular é direcionado para a produção de alanina e, assim que a glutamina é totalmente consumida, o piruvato produzido na via glicolítica deixa de ser consumido pela via da alanina aminotransferase, sendo, então, direcionado para a produção de lactato (Figuras B.1d, B.1e e B.2a).

É importante ressaltar que, apesar de ter-se observado que esta linhagem consegue utilizar o glutamato presente no meio de cultura para o crescimento após o esgotamento da glutamina, não há indícios de que o glutamato também seja utilizado para a produção de alanina, uma vez que o instante em que há esgotamento de glutamina coincide com o instante do aumento de velocidade de produção de lactato, evidenciado pelo aumento da inclinação da curva de produção deste subproduto (Figuras B.1d, B.1e e B.2f).

O pH foi controlado entre 7,2 e 7,5 (Figura B.1b), durante todo o período do ensaio, exceto nas últimas horas, quando se observou um aumento neste valor, provavelmente devido à formação de NH_4^+ , advinda do consumo de glutamato na segunda metade do ensaio.

O controle do pH foi feito pela adição de base (NaHCO₃) e ácido (HCl). A base é adicionada desde o início dos ensaios com o objetivo de controlar o pH em decorrência da produção de ácido láctico (Figura B.5a). É possível observar uma correlação entre a adição de base e a produção de lactato nas primeiras 90 horas do ensaio (Figuras B.1d e B.5a). No entanto, após este período, há uma adição de apenas 5% de base, enquanto que se produz mais 35% de lactato. Desta forma, deve-se levantar a hipótese de que algum outro aspecto do metabolismo, provavelmente ligado ao metabolismo de aminoácidos, produz algum subproduto capaz de compensar a queda de pH causada pela produção de lactato, de forma que o pH se mantém estável sem que haja a necessidade de adicionar mais base.

As figuras B.6 e B.7 mostram os resultados obtidos no conjunto de ensaios para estudo do efeito do oxigênio dissolvido (Ensaios 50 a 52), a figura B.8 mostra os resultados das principais grandezas cinéticas obtidas e as tabelas B.1 e B.2 mostram os valores das variáveis de estado nos instantes críticos do processo e os valores das grandezas cinéticas calculadas na fase exponencial de crescimento, respectivamente, para todos os ensaios realizados.

Todos os ensaios foram adequadamente controlados para os valores de oxigênio dissolvido designados, ou seja, não houve flutuação significativa neste valores para além dos *set-points* estabelecidos (Figuras B.5b, B.7b e B.7d), de forma que todos os efeitos observados podem ser diretamente relacionados às mudanças neste parâmetro. Para o Ensaio 50 foi obtida uma média deste parâmetro de 29,73% (CV = 19,47%), para o Ensaio 51, a média foi de 5,03% (CV = 1,93%) e para o Ensaio 52 a média foi de 50,07% (CV = 5,17%).



Figura B.6 - Resultados alisados através do método *spline* dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. (a) Crescimento celular (Xv); (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) pH; e (f) Concentração de NH₄⁺. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial dos Ensaios 50 (linha contínua azul), 51 (linha contínua vermelha) e 52 (linha tracejada preta).

O Ensaio 52 foi o único a apresentar fase lag com duração de 19,4 horas (Tabela B.1). Não há indícios de que esta fase lag esteja relacionada com a condição estudada e também não parece ser devido a concentrações iniciais baixas (X₀) no biorreator, uma vez que todos os ensaios foram iniciados com valores equivalentes de X₀, sendo que este não apresentou variações significativas entre os ensaios (Média = $2,06x10^5$ cel/mL, CV = 5,82%, Tabela 5.12). Assim, supõe-se que a ocorrência desta fase está relacionada à necessidade de um período de adaptação provavelmente devido à transferência de um ambiente sem controle de variáveis importantes, como o pH e o pO₂ (frasco *Spinner*), para um ambiente completamente controlado (biorreator).

Observa-se que, em todos os ensaios, o final da fase exponencial ocorre quando ainda restam aproximadamente 2 g/L de glicose disponíveis no meio (Figuras B.6a e B.6c, Tabela B.1). No entanto, o esgotamento deste substrato ocorre em instantes próximos à morte celular (Figuras B.6b e B.6c, Tabela C.1), indicando que a glicose pode ser responsável pela manutenção da viabilidade celular.



Figura B.7 - Variáveis de estado dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. Volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH nos ensaios (a) 51; e (c) 52; e percentual de oxigênio dissolvido nos ensaios (b) 51; e (d) 52. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial de crescimento.

As análises de glutamina só estão disponíveis para o Ensaio 50. No entanto, para os Ensaios 51 e 52, é possível inferir, a partir do perfil de produção de NH_4^+ , identificando o instante no qual a produção deste subproduto é interrompida ou severamente reduzida, é o instante no qual ocorre o esgotamento de glutamina. Este instante, coincide com o final da fase exponencial destes cultivos (Figuras B.1a, B.1e, B.6a e B.6f). Desta forma, a glutamina parece ser o substrato limitante do crescimento celular neste conjunto de ensaios.

As concentrações máximas de lactato são atingidas entre 20 e 25 horas após o fim da fase exponencial e encontram-se na faixa entre 3,0 e 4,5 g/L (Figura B.6d). Apesar de não parecer haver efeitos de inibição ao crescimento celular, estas concentrações podem ter influenciado no início da morte celular (AMABLE e BUTLER, 2008; OZTURK et al., 1992). Também é possível observar que a produção de lactato é inversamente proporcional à disponibilidade de oxigênio, ou seja, a maior concentração de lactato foi obtida no ensaio com menor concentração de oxigênio dissolvido (Ensaio 51, Figura B.6d). Este resultado era esperado, pois a menor disponibilidade de oxigênio favorece as vias fermentativas, cujo produto final é o próprio lactato.

Diferentemente do lactato, a produção de amônio não apresenta diferenças significativas entre os ensaios, de forma que no final da fase exponencial, estes ensaios apresentaram em média 55,22 mg/L de amônio (CV = 5,38%), o que sugere que a via metabólica de consumo de glutamina não é alterada de acordo com a disponibilidade de oxigênio. Como já foi mencionado, as concentrações de amônio ao final da fase exponencial estão entre 50 e 60 mg/L (Figura B.6f) e são consideradas altas, podendo exercer efeito de inibição ao crescimento celular.

Em todos os ensaios deste conjunto, como já havia sido mencionado para o Ensaio 50, a quantidade de base utilizada para o controle de pH não se correlaciona com a quantidade de lactato produzido, como era esperado. Em todos os ensaios, a adição de base é severamente reduzida por volta de 100h. Após este instante, o volume adicionado aumenta em 5%, 4% e 2,3% para os Ensaios 50, 51 e 52, respectivamente (Figuras B.5a, B.7a e B.7c). O lactato produzido, por sua vez, tem um acréscimo de 35%, 20% e 61% nos Ensaios 50, 51 e 52, respectivamente (Figura B.6d). Apesar disso, os valores de pH mantêm-se controlados (Figura B.6e). Não está claro qual é o efeito capaz de manter o pH estável apesar da produção de lactato, mas é evidente que há uma alteração metabólica neste momento, de forma que algum subproduto de teor básico passa a ser produzido.

O crescimento celular obtido na condição com pO₂ a 30% da saturação foi superior àqueles observados para 5% e 50% em cerca de 20% (Tabela B.1; Figura B.8a). Da mesma forma, o valor de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) foi cerca de 24% maior (Figura B.8a). Assim, no que se refere ao crescimento celular, esta condição se mostra superior às outras estudadas.

Em cultivos com células animais, a concentração de oxigênio que mais favorece o crescimento é muito específica para a linhagem utilizada, de forma que é muito difícil estabelecer uma tendência. Em estudos com células BHK, Augusto et al. (2000) identificaram

a condição de 10% de oxigênio dissolvido como ótima para a produção celular. Miller et al (1987) identificaram o valor de 0,5% como o pO₂ ótimo para o crescimento de uma linhagem de hibridoma, enquanto que Mizrahi (1982) verificou que a condição de 50% era a que maximizava o crescimento de células de linfoblastos humanos.



Figura B.8 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 50, 51 e 52 (Tabela 4.4), com as condições de 30, 5 e 50% de oxigênio dissolvido, respectivamente, para avaliação do efeito do pO₂. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. (a) Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) e crescimento celular (ΔX); (b) Fator de conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$); (c) Fator de produção de amônio por células ($Y_{NH4/X}$); e (d) Fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$).

Link et al. (2004) não observaram diferenças significativas no crescimento celular de uma linhagem de células CHO cultivadas em condições de pO_2 entre 40 e 60%. No entanto, quando se reduziu a concentração de oxigênio para 5%, observou-se uma redução de quase 80% no crescimento celular.

Em alguns casos, uma mesma linhagem cultivada em meios diferentes pode necessitar concentrações de oxigênio dissolvido diferentes para maximizar o crescimento. Em cultivos de células de inseto *Drosophila melanogaster*, Batista et al. (2008) identificaram a condição de 40% pO₂ como a ideal para o crescimento em meio RPMi, enquanto que Aguiar (2010) verificou que a condição de 5% era a melhor em cultivo em meio TC100.

Pode-se observar que na condição com 30% de oxigênio dissolvido também há o melhor aproveitamento de glicose para a produção de células ($Y_{X/GLC}$), cujo valor obtido é 25% e 51% maior que nos ensaios de 50% e 5%, respectivamente (Tabela B.2; Figura B.8b). Os valores do fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) diminuem conforme se aumenta a disponibilidade de oxigênio no sistema (Figura B.8d), o que é esperado, uma vez que a maior disponibilidade de oxigênio deve aumentar o fluxo de piruvato no TCA, e diminuir a fermentação no metabolismo celular, a qual resulta na formação de lactato.

Por outro lado, o aumento da concentração de oxigênio no sistema não parece exercer influência significativa na formação de NH_4^+ (Figura B.8c).

Estas mudanças no metabolismo de acordo com a concentração de oxigênio dissolvido são muito específicas para a linhagem celular estudada. Jan et al. (1997) mostraram que, em cultivos com hibridoma, o fator de conversão de glutamina a amônio ($Y_{NH4/GLN}$) não sofria alterações em condições entre 10 e 125% de oxigênio dissolvido. Nesta mesma faixa de operação, o fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$) aumentou 20%.

B.2) Avaliação da influência da concentração inicial de glutamina (GLN₀)

Nestes ensaios, os valores de GLN_0 variaram entre 175 e 1050 mg/L, enquanto que as outras variáveis foram mantidas constantes. As figuras B.9 e B.10 mostram os resultados dos Ensaios 53 a 56 (Tabela 4.4) e a Figura B.11 mostra a comparação entre as grandezas cinéticas obtidas nestes ensaios. As Tabelas B.1 e B.2 mostram os valores dos parâmetros e das variáveis nos instantes críticos do processo.



Figura B.9 - Resultados alisados através do método *spline* dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com as condições de 700, 350, 1050 e 175 mg/L de GLN₀, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a ou 6b, em biorreator. (a) Crescimento celular (Xv); (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) pH; e (f) Concentração de NH₄⁺. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial dos Ensaios 53 (linha contínua azul), 54 (linha contínua vermelha), 55 (linha tracejada preta) e 56 (linha tracejada vermelha).

O ensaio referência para este conjunto de ensaios, a princípio, seria o número 50. No entanto, para que se pudesse adicionar uma concentração maior de glicose e glutamina e, assim, aumentar a faixa de estudo, decidiu avaliar-se o efeito de uma maior osmolalidade ao crescimento celular. Assim, o Ensaio 53 foi feito sob as mesmas condições que o 50, mas com osmolalidade de 320 mOsm/kg, enquanto que a do Ensaio 50 foi de 270 mOsm/kg. Desta forma, para se poder fazer uma comparação, todos os ensaios dos quadros de glicose e glutamina foram realizados com meio de cultura com osmolalidade de 320 mOsm/kg.



Figura B.10 - Variáveis de estado dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com as condições de 700, 350, 1050 e 175 mg/L de GLN₀, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. Volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH nos ensaios (a) 53; (c) 54; (e) 55; e (g) 56; e percentual de oxigênio dissolvido nos ensaios (b) 53; (d) 54; (f) 55; e (h) 56. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial.

Em nenhum dos ensaios foram observadas fase lag extensas no início do crescimento celular (Figura B.9a, Tabela B.1), o que indica que estas concentrações não são altas o

suficiente para se atingir uma situação de inibição por substrato. Mais uma vez, também não foram observadas fases estacionárias após a interrupção do crescimento (Figura B.9a). Em todos os ensaios, a viabilidade se mantém alta (maior que 90%) durante toda a fase de crescimento exponencial e, após a interrupção do crescimento celular, este valor apresenta uma queda abrupta (Figura B.9b).

Não foram feitas análises de aminoácidos para estes ensaios. No entanto, é possível identificar o instante no qual há o esgotamento de glutamina, por ser o instante no qual a formação de NH_4^+ é interrompida ou severamente reduzida. Assim, observa-se que nos Ensaios 53, 55 e 56 (700, 1050 e 175 mg/L GLN₀, respectivamente) este aminoácido se esgota no instante no qual há a interrupção do crescimento exponencial (Figura B.9f), o que sugere que o esgotamento deste aminoácido é responsável pela limitação do crescimento.

No Ensaio 54 (350 mg/L GLN₀), o perfil de NH₄⁺ sugere que o crescimento exponencial é interrompido 25 horas após o esgotamento de glutamina (Figuras B.9a e B.9f). No entanto, sabe-se que maiores concentrações de substrato levam a um consumo mais desregulado dos mesmos, levando à maior produção de subprodutos (ALTAMIRANO et al., 2008). Sendo esta uma condição com menor concentração de glutamina (350 mg/L), o metabolismo celular pode ter sido alterado de forma a produzir menos NH₄⁺ e mais biomassa. Como consequência desta hipótese, a glutamina não se esgotaria em 51 horas, como o perfil de NH₄⁺ sugere, e sim no mesmo instante em ocorre o fim da fase exponencial. Esperar-se-ia o mesmo comportamento no Ensaio 56 (175 mg/L GLN₀). Entretanto, este ensaio está sujeito a uma condição de limitação intensa de forma que este efeito não é tão claro. No entanto, esta hipótese só poderia ser confirmada com a realização das análises de aminoácidos.

Em todos os ensaios, há disponibilidade de glicose no final da fase exponencial de crescimento (Figuras B.9a e B.9c), o que sugere, mais uma vez, que este substrato não é responsável pela interrupção desta fase do crescimento. Pode-se destacar que, a concentração de glicose disponível no meio de cultura no final da fase exponencial é maior para os menores valores de GLN₀, o que reforça a hipótese de limitação por glutamina.

Nos Ensaios 53, 54 e 55 (700, 350 e 1050 mg/L de GLN_0 , respectivamente), observa-se que o esgotamento da glicose ocorre no mesmo instante no qual há a interrupção do crescimento celular e, na sequência, o início da morte celular (Figuras B.9a, B.9b e B.9c). Desta forma, a glicose parece ser a responsável pela manutenção da viabilidade celular e a disponibilidade deste substrato parece favorecer o crescimento, mesmo que não em exponencial. No Ensaio 56 (175 mg/L GLN₀), não se observa esta relação entre a disponibilidade de glicose e a manutenção da viabilidade. No entanto, deve-se destacar que

esta é uma condição muito limitada e que outros efeitos podem causar a queda da viabilidade celular antes do esgotamento da glicose.

Neste conjunto de ensaios, observa-se que a adição de base para controle do pH tem um perfil que pode ser correlacionado com a curvas de produção de lactato (Figuras B.9d, B.10a, B.10c, B.10e e B.10g). Além disso, em todos os ensaios, a concentração inicial de glutamina, a quantidade de lactato produzido e, consequentemente, a quantidade de base consumida são diretamente proporcionais. Este comportamento metabólico provavelmente está relacionado com a produção de alanina. Como já foi dito anteriormente, enquanto há glutamina disponível no meio de cultura, o metabolismo celular é direcionado para a produção de alanina e, assim que a glutamina é totalmente consumida, o piruvato produzido na via glicolítica passa a ser direcionado para a produção de lactato.

Zagari et al. (2013) observaram comportamento semelhante em um clone de células CHO e associaram este comportamento a uma reduzida capacidade oxidativa da mitocôndria da linhagem celular. Uma hipótese para esta redução é que a regulação das enzimas e sistemas de transporte da mitocôndria está diretamente relacionada a componentes não conhecidos do meio de cultura.

Em particular, a concentração de lactato obtida no ensaio com 1050 mg/L, de 5,45 g/L (Figura B.9d, Tabela B.1) pode ser considerada uma concentração inibitória ao crescimento. Os valores atingidos nos outros ensaios são mais baixos de forma que não há indícios de inibição por lactato. Também se observa, nos Ensaios 53 e 55 (700 e 1050 mg/L de GLN_0 , respectivamente), o reconsumo de lactato após o esgotamento da glicose (Figuras B.9c e B.9d, Tabela B.1).

Com relação às grandezas cinéticas, pode-se observar que a variação de glutamina não influencia significativamente a velocidade exponencial de crescimento celular (Figura B.11a, Tabela B.2). No entanto, as condições com 350 e 700 mg/L apresentam os maiores crescimentos celulares, com valor médio 46% maior que a segunda melhor condição, com 1050 mg/L (Figura B.11a, Tabela B.1).

A variação das condições iniciais de cultivo causam respostas diferentes de acordo com a linhagem celular estudada. Jeong e Wang (1995) estudaram o efeito da concentração inicial de glutamina em cultivos de hibridoma e obtiveram resultados distintos daqueles aqui obtidos. O crescimento celular (ΔX) aumentou ao se aumentar a concentração inicial de glutamina de 0 para 300 mg/L, mas manteve-se constante entre 300 e 875 mg/L. Os valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) mantiveram-se constantes entre 73 mg/L e 875 mg/L, mas apresentaram uma queda acentuada quando a concentração de glutamina foi reduzida de 73 para 0 mg/L.

Pode-se observar que a variação na concentração inicial de glutamina causou alterações no metabolismo celular. A produção de NH_4^+ segue um comportamento esperado, sendo maior conforme se aumenta a disponibilidade de glutamina (AMABLE & BUTLER, 2008). Assim, a condição com 1050 mg/L é a que apresenta maior produção de NH_4^+ por célula, cujo valor é 33% maior que a do ensaio com 700 mg/L, que é a condição com a segunda maior produção de NH_4^+ por célula (Figura B.11c).



Figura B.11 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 53, 54, 55 e 56 (Tabela 4.4), com as condições de 700, 350, 1050 e 175 mg/L de GLN₀, respectivamente, para avaliação do efeito da GLN₀. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. (a) Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) e crescimento celular (ΔX); (b) Fator de conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$); (c) Fator de produção de amônio por células ($Y_{NH4/X}$); e (d) Fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$).

Além disso, também se observou variações nos valores do fator de conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$) e de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$), o que sugere que os metabolismos destes dois substratos são interdependentes.

A condição com 350 mg/L apresenta a maior eficiência na conversão de glicose a células, com $Y_{X/GLC}$, em média, 30% maior que os dos ensaios com 175 e 700 mg/L, que são as segundas melhores condições (Figura B.11b, Tabela B.2). Apesar disso, a condição de

700 mg/L de GLN é a que produz menos lactato por glicose consumida, apresentando $Y_{LAC/GLC}$ 40% menor que o do ensaio com 350 mg/L (Tabela B.2; Figura B.11d). Isto pode ser explicado pelo fato da condição com 700 mg/L, quando comparada às condições de 175 e 350 mg/L, apresentar maior velocidade de consumo de glicose e igual velocidade de produção de lactato. Estas velocidades podem ser inferidas através das inclinações das curvas de concentração de glicose e lactato nestes ensaios (Figuras B.9c e B.9d). Este aumento de velocidade de consumo de glicose também é observado no ensaio com 1050 mg/L de GLN₀. No entanto, observa-se também um aumento na velocidade de produção de lactato, o que resulta em um maior valor de $Y_{LAC/GLC}$. Pode-se destacar que este aumento na velocidade de consumo de glicose provavelmente está relacionado com o esgotamento deste substrato nestes dois ensaios.

B.3) Avaliação da influência da concentração inicial de glicose (GLC₀)

A influência da concentração de glicose foi estudada avaliando a faixa entre 2 e 17g/L. As figuras B.12 e B.13 mostram os resultados dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.2) e a Figura B.14 mostra a comparação entre as grandezas cinéticas obtidas. As tabelas B.1 e B.2 mostram os valores dos parâmetros e das variáveis nos instantes críticos do processo.

Neste conjunto de ensaios, observa-se mais uma vez, uma fase lag de aproximadamente 20 horas em todos os ensaios, indicando que a linhagem passa por um período de adaptação ao passar do frasco *Spinner* para o biorreator (Figura B.12a). No entanto, estas fases de adaptação são muito curtas, de forma que não se acredita ter havido quaisquer efeitos de inibição por excesso de substrato nestes ensaios.

Mais uma vez, observa-se que não há uma fase estacionária após a interrupção do crescimento (Figuras B.12a). A viabilidade se mantém alta durante toda a fase de crescimento exponencial e, após a interrupção desta fase do crescimento, a viabilidade apresenta uma rápida queda, atingindo valores de até 20% (Figuras B.12b).



Figura B.12 - Resultados alisados através do método *spline* dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com as condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. (a) Crescimento celular (Xv); (b) Viabilidade celular; (c) Concentração de glicose; (d) Concentração de lactato; (e) pH; e (f) Concentração de NH₄⁺. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial dos Ensaios 53 (linha contínua azul), 54 (linha contínua vermelha), 55 (linha tracejada preta) e 56 (linha tracejada vermelha).

Como já foi mencionado, analisando o perfil de formação de NH_4^+ , conclui-se que a fase exponencial do Ensaio 53 (8 g/L de GLC_0) é interrompida no momento em que a glutamina se esgota no meio de cultura (Figura B.12f). No Ensaio 57 (17 g/L GLC_0), o perfil de NH_4^+ parece sugerir que a fase exponencial é interrompida aproximadamente 10 horas após o esgotamento da glutamina (Figura B.12f). No entanto, analisando a proporção entre as concentrações iniciais de glicose e glutamina, observamos que se tem uma condição muito semelhante à do Ensaio 54 (ambos apresentam $[GLN_0]/[GLC_0] = 0,04$) onde, por se ter uma concentração de glutamina baixa em relação à concentração de glicose, a utilização deste

aminoácido é direcionada para a produção de biomassa e, assim, a conversão para NH_4^+ diminui, de forma que a glutamina pode se esgotar algumas horas depois da interrupção da produção de NH_4^+ . Este argumento pode ser reforçado pelo fato do Ensaio 57 ser o que menos produziu NH_4^+ (Figura B.12f), apesar de todos os ensaios terem começado com a mesma concentração inicial de glutamina. Isto também reforça a hipótese de que os metabolismos de glicose e glutamina estão interdependentes.

Além disso, ao final da fase exponencial, a concentração de lactato atingida no Ensaio 57 (17 g/L de GLC₀) pode ser considerada alta (5,13 g/L, Figura B.12d, Tabela B.1), de forma que o final do crescimento exponencial e o início da morte celular também podem ter ocorrido devido à inibição por excesso deste substrato. As máximas concentrações de lactato dos outros ensaios estão próximos de 3,0 g/L (Figura B.12d) e não parecem altas o suficiente para causar efeitos de inibição nestes cultivos. No entanto, para se obter uma confirmação desta hipótese, seria necessário realizar ensaios especificamente planejados para esta finalidade.

O Ensaio 59 (2 g/L de GLC_0) é o único cuja interrupção do crescimento exponencial não parece estar relacionado ao esgotamento de glutamina (Figuras B.12a e B.12f). A análise deste ensaio sugere que o esgotamento de glicose leva ao término da fase exponencial, diferentemente do que foi observado em todos os outros ensaios (Figuras B.12a e B.12c). Assim, pode-se levantar a hipótese de que a fase exponencial está relacionada à disponibilidade tanto de glicose como de glutamina. Pelo fato da glutamina estar presente em concentrações mais baixas no meio de cultura, ela é, em geral, consumida mais rapidamente e, por isso, é responsável pela interrupção na maior parte dos casos. No Ensaio 58 (4 g/L de GLC_0), o final da fase exponencial ocorre no instante em que ambos os substratos se esgotam (Figuras B.9a e B.9c), de forma que ambos são responsáveis pela interrupção do crescimento em exponencial.



Figura B.13 - Variáveis de estado dos Ensaios Ensaios 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com as condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente. Resultados de volume de base adicionada alisados através do método *spline*. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. Volume de base (NaHCO₃) adicionada para controle de pH nos ensaios (a) 57; (c) 58; e (e) 59; e percentual de oxigênio dissolvido nos ensaios (b) 57; (d) 58; e (f) 59. As linhas verticais indicam o instante do fim da fase exponencial.

Analisando os gráficos dos Ensaios 53, 58 e 59 (8, 4 e 2 g/L GLC₀, respectivamente), tem-se indícios de que a manutenção da viabilidade está diretamente relacionada à disponibilidade de glicose, uma vez que a viabilidade começa a cair rapidamente no mesmo instante que a glicose se esgota (Figuras B.12a, B.12b e B.12c).

Mais uma vez, observou-se que, quando a concentração de glicose começa a chegar próxima a zero, o lactato começa a ser reconsumido, indicando que este subproduto pode ser utilizado como fonte alternativa de carbono (Figura B.12c e B.12d). Deve-se, inclusive, ressaltar que no Ensaio 58 (4 g/L de GLC_0), o lactato é consumido durante as últimas 20 horas

da fase exponencial, mostrando que o esgotamento da glicose não afetou o $\mu_{X,MAX}$ deste ensaio.

Também é possível observar comportamentos distintos quanto à adição de base para controle de pH. No Ensaio 57 (17 g/L de GLC_0), observa-se uma correlação entre a quantidade de base adicionada e o lactato produzido (Figuras B.12d e B.13a) até aproximadamente 100 horas, instante no qual observa-se uma redução na inclinação do perfil de adição de base, enquanto que não se observa redução semelhante na produção de lactato. Mais uma vez, acredita-se que houve uma mudança metabólica, na qual algum subproduto com teor básico começou a ser produzido, diminuindo a necessidade de adição de base.

O Ensaio 58 (4 g/L de GLC_0) mostra perfis de adição de base e de produção de lactato completamente correlacionáveis (Figuras B.12d e B.13c). Por outro lado, não é possível observar nenhuma correlação entre estas duas variáveis no Ensaio 59, com 2 g/L de GLC_0 (Figuras B.12d e B.13e). Uma explicação para isto é o fato da concentração de lactato produzida ser muito baixa neste ensaio, de forma que a adição de base pode ter ocorrido devido a outros fatores que, em condições com maiores concentrações de lactato são menos relevantes.

A produção de NH_4^+ é inversamente proporcional à concentração de glicose inicial nos ensaios (Figuras B.12c e B.12f), provavelmente devido à interdependência entre os metabolismos de glicose e glutamina. Ao aumentar a concentração de glicose de 2 para 17 g/L, causa-se, proporcionalmente, uma condição de limitação de glutamina. Como já foi mencionado, esta condição resulta em um consumo mais eficiente deste aminoácido, produzindo menores concentrações de NH_4^+ , nas condições com maior disponibilidade de glicose. Os Ensaios 58 e 59 (4 e 2 g/L de GLC_0 , respectivamente) apresentam as maiores concentrações no instante de interrupção da fase exponencial (98 e 60 mg/L, respectivamente, Figura B.12f, Tabela B.1). Estas concentrações são consideradas altas e podem ter exercido efeito inibitório ao crescimento celular.

Entre 4 e 17 g/L de GLC_0 , não foi observada variação significativa nos valores de $\mu_{X,MAX}$ (Tabela B.2; Figura B.14a). Entretanto, a condição com 2 g/L de GLC_0 apresentou uma velocidade específica de crescimento aproximadamente 40% inferior à das outras condições, evidenciando que está é uma condição limitante ao crescimento celular. É possível observar uma correlação direta entre a disponibilidade de glicose e o crescimento celular. O maior valor de crescimento, obtido com 17 g/L de GLC_0 , foi 32% maior que o crescimento obtido na segunda melhor condição, com 8 g/L de GLC_0 (Figura B.14a, Tabela B.1).

Mais uma vez, foram observadas alterações no metabolismo, em decorrência da alteração da concentração inicial de substrato. A conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$) aumenta quase 4 vezes conforme se aumenta a disponibilidade de glicose de 2 para 8 g/L. Por outro lado, parece manter-se constante na faixa entre 8 e 17 g/L (Figura B.14b, Tabela B.2).



Figura B.14 - Comparação das grandezas cinéticas obtidas dos Ensaios 53, 57, 58 e 59 (Tabela 4.4), com as condições de 8, 17, 4 e 2 g/L de GLC₀, respectivamente, para avaliação do efeito da GLC₀. Linhagem rHeLaHyCDSp, Meio 6a, em biorreator. (a) Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MAX}$) e crescimento celular (ΔX); (b) Fator de conversão de glicose a células ($Y_{X/GLC}$); (c) Fator de produção de amônio por células ($Y_{NH4/X}$); e (d) Fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$).

A produção de lactato por glicose consumida ($Y_{LAC/GLC}$) também apresentou alterações (Figura B.14d). O aumento de GLC₀ de 8 para 17 g/L causa um aumento de 78% em $Y_{LAC/GLC}$, o que era esperado, uma vez que, em condições de maior disponibilidade de glicose, células animais tendem a aumentar a velocidade de consumo deste substrato, diminuindo sua eficiência e produzindo mais lactato (ALTAMIRANO et al., 2008). No entanto, o aumento de GLC₀ de 2 para 8 g/L mostrou um resultado inesperado: uma diminuição de aproximadamente 40% em $Y_{LAC/GLC}$, o que evidencia a condição de limitação à qual a linhagem é submetida na condição com 2 g/L de GLC₀.

Cruz et al. (1999) também observaram que, em cultivos de células BHK, a variação da concentração inicial de glicose entre 0,1 e 5,4 g/L não alterou o valor do fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$). A adição de concentrações menores que 0,1 g/L de glicose, no entanto, implicou em menores valores de $Y_{LAC/GLC}$. Isto pode ser uma indicação de que, caso este estudo englobasse concentrações iniciais ainda menores de glicose, esta redução nos valores de $Y_{LAC/GLC}$ seria observada.

O fator de conversão de amônio por células ($Y_{NH4/X}$) apresenta um perfil de maior produção de amônio, quando a disponibilidade de glicose é menor (Figura B.14c, Tabela B.2). Como já foi mencionado, uma hipótese para este comportamento é a interdependência entre os metabolismos de glicose e glutamina, de forma que, proporcionalmente, concentrações iniciais elevadas de glicose causam uma condição de limitação de glutamina, resultando em baixa produção de amônio.



A) Frasco Spinner

Figura C.1 - Resultados do Ensaio 63 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular (contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada).
(a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura C.2 - Resultados do Ensaio 64 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de amônio; e (e) Concentração de rFVIII.



Figura C.3 - Resultados do Ensaio 65 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento celular (vermelha contínua) e o início da morte celular (vermelha tracejada). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de amônio; e (e) Concentração de rFVIII.



Figura C.4 - Resultados do Ensaio 66 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de amônio; e (e) Concentração de rFVIII.



Figura C.5 - Resultados do Ensaio 67 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de amônio; e (e) Concentração de rFVIII.



Figura C.6 - Resultados do Ensaio 68 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de amônio; e (e) Concentração de rFVIII.



Figura C.7 - Resultados do Ensaio 69 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento, o fim do crescimento e o início da morte celular (azul contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de amônio; e (e) Concentração de rFVIII.



Figura C.8 - Resultados do Ensaio 70 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; e (d) Concentração de amônio.



Figura C.9 - Resultados do Ensaio 71 (Tabela 4.6), com a linhagem rSKHep, com o Meio 1a, em *Spinner*. As linhas verticais indicam o fim da fase lag (preta tracejada), o fim da fase exponencial de crescimento celular (azul contínua), o fim do crescimento e o início da morte celular (vermelha contínua). (a) Concentração e viabilidade celular; (b) pH; (c) Concentrações de glicose e lactato; (d) Concentração de amônio; e (e) Concentração de rFVIII.