IVANA BARROS DE CAMPOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
VACINA CELULAR CONTRA
*Streptococcus pneumoniae***

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

São Paulo
2014

IVANA BARROS DE CAMPOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
VACINA CELULAR CONTRA
*Streptococcus pneumoniae***

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: Dra. Viviane M. Gonçalves

Co-orientadora: Dra. Luciana C. C. Leite

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

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

Campos, Ivana Barros de.

Otimização do processo de produção e caracterização da vacina celular contra *Streptococcus pneumoniae* / Ivana Barros de Campos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves.

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: Desenvolvimento de bioprocessos para produção de vacinas.

Versão do título para o inglês: Optimization of the production process and characterization of *Streptococcus pneumoniae* whole cell vaccine.

1. *Streptococcus* 2. Bioprocessos 3. Fermentação contínua 4. Vacinas 5. Imunoensaio 6. Fagocitose I. Gonçalves, Profa. Dra. Viviane Maimoni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0157/2014

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

Candidato(a): Ivana Barros de Campos.

Título da Tese: Otimização do processo de produção e caracterização da vacina celular contra *Streptococcus pneumoniae*.

Orientador(a): Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **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:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Otimização do processo de produção e caracterização da vacina celular contra *Streptococcus pneumoniae*", **protocolo nº 1141/13**, sob a responsabilidade de Viviane Maimoni Gonçalves e Ivana Barros de Campos – que envolve a utilização de amostras de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/12/2013.

Vigência do Projeto: 12/2013 - 09/2014	Nº de animais/espécie
Centro de Biotecnologia	Amostras de 210 camundongos C57BL/6 4-6s (F) trazidas dos Estados Unidos da América*

São Paulo, 12 de dezembro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

*O protocolo de utilização de camundongos foi aprovado pelo *Children's Hospital Boston Animal Care and Use Committee*, protocol 10-12-1863R.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os amigos do Instituto Butantan, principalmente Marina, Vanessa, Vivian, Sandra, Karina G, Leme, Erika, Juliano, Dani, Alex, Miréia e tantos outros que de alguma forma colaboraram, desde o empréstimo de um reagente, uma informação preciosa, apoio técnico até apoio moral. Obrigada pelos 12 anos de companheirismo.

Aos eternos amigos Eneas, Karina, Ana, Juliana, Agatha, Inácio, Henrique, que sempre me apoiaram.

Ao Paulo Lee Ho, por abrir às portas do Butantan, e sempre acreditar em mim. Também à Maria Leonor Oliveira pelos primeiros ensinamentos na minha carreira científica.

À Anatercia Bonfim Yano, por ter acreditado em mim, e por tudo que me ajudou e me ensinou.

Aos colegas de disciplina, Aline, Luís, Thiago, Andrews, Bruno, Thalita, Katie, Marcela, Giovanna que me libertavam dos estresses do laboratório, e que tiveram paciência esperando minhas intermináveis contagens de colônias.

Aos vários e muito bons amigos do Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia, que me abrigaram na minha fase “homeless”, e que me receberam muito bem, além das ajudas com HPLC, principalmente ao Douglas, Anne, Stephani, Wallace, Joaquim, Bruno, Cadu, Felipe, Rafa, Paola, Ana, Lori, Máximo, Hélio, dentre muitos outros.

À equipe do projeto Pneumo Celular pelo apoio, principalmente nos cultivos de 60 L: Waldely Dias, Beth Sbrogio, Celia Liberman e demais.

À Monica Gomes Brilhante, que me ajudou muito no início de tudo, me ensinou, me apoiou, sempre com seu sorriso meigo, pronta a ajudar. Tenho certeza que se não fosse pelas surpresas da vida você estaria comigo. Esta conquista também é pra você.

À equipe do Laboratório Especial Piloto de Produtos Biológicos Recombinant, que me ajudaram nas aparentemente simples, mas na verdade exaustivas etapas que compõe o processo fermentativo, e que todo mundo esquece quanto são importantes: Claudia, Raimunda, Alessandra, Marilene, Nelson, Izabel.

Ao Fernando Fratelli, por ter aberto às portas de seu laboratório, e ter permitido que eu desenvolvesse meu projeto.

À equipe do Dr. Richard Malley que me ensinou, ajudou e que sempre foi prestativa e paciente, principalmente ao Rick por ter me recebido em seu laboratório e pela ótima oportunidade.

Ao CNPq pelo financiamento do doutorado sanduiche, e ao PATH pelo financiamento do meu projeto.

À equipe do Instituto Adolfo Lutz de Santo André, por ter me recebido muito bem, pela compreensão e por colaborar durante uma das etapas mais difíceis a escrita da tese, principalmente Vilma, Regina, Dani, Patrícia, Ana, Delma, Nilma, Gisele.

À Luciana Leite, pelo apoio, por acreditar na minha ideia de projeto e pela confiança no meu trabalho. Agradeço também à equipe de seu laboratório, pela super ajuda durante a fase dos ensaios imunológicos, principalmente ao Thiago, Dunia, Michelle, e pela ajuda com os ensaios de citometria de fluxo, principalmente a Cibelly.

Ao Celso Cardoso, pelo companheirismo, apoio e incansável ajuda nos processos fermentativos, e sempre com o inesgotável bom humor. Obrigada por você ser meus braços extras na parte mais árdua do trabalho.

À minha orientadora, Viviane Gonçalves - Vivi, pela confiança em mim depositada, pela orientação, pela ajuda, pelas discussões, e principalmente pela amizade. Obrigada por ter acreditado em mim, e me apoiar nesta empreitada, por me ajudar a ser uma pessoa e uma profissional melhor.

À minha família, pelo apoio, amor, e alegria que preenchem minha vida. Desculpem pelas ausências e obrigada pela compreensão. E principalmente ao meu marido, Israel, pela eterna paciência, nos momentos de estresse, que sempre são a maioria. E por sempre ser o primeiro a acreditar na minha capacidade.

*“ O melhor destino que se pode dar a uma vida é dedicá-la a algo que
dure mais do que a própria vida”*

Johann W. Von Goethe

RESUMO

Campos IB. Otimização do processo de produção e caracterização da vacina celular contra *Streptococcus pneumoniae*. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Nos últimos anos, diferentes grupos têm concentrado esforços no desenvolvimento de novas vacinas contra *Streptococcus pneumoniae*, pois as vacinas atuais apresentam alguns problemas como: não induzem resposta imune com cobertura abrangente contra os mais de 90 sorotipos existentes, levando à substituição dos sorotipos prevalentes na população vacinada; são produzidas com base nos sorotipos prevalentes nos Estados Unidos e Europa, o que em geral representa menor cobertura em outros países; são baseadas nos polissacarídeos capsulares, cuja obtenção é relativamente barata, porém os polissacarídeos devem ser conjugados a proteínas carregadoras para que a vacina seja efetiva em crianças e o custo para conjugação é extremamente elevado, o que limita o uso das vacinas conjugadas em países em desenvolvimento. Uma vacina baseada na bactéria inteira inativada, empregando uma cepa não encapsulada, poderia solucionar os problemas apresentados pelas vacinas atuais, pois esta vacina celular induziria uma resposta imune independente de sorotipos e baseada no conjunto de proteínas do patógeno. Além disso, esta vacina seria de baixo custo, pois não seriam necessárias etapas individuais de purificação de polissacarídeos e proteínas e posterior conjugação, como no caso das vacinas comerciais. Um processo para produção dessa vacina celular (WCV) foi desenvolvido no Instituto Butantan utilizando o cultivo descontínuo, no qual se obtém quantidade inferior de biomassa em comparação com outros processos fermentativos. Por isso, para otimização do processo de produção e obtenção de maior número de doses por lote, foram avaliados os processos descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células em biorreator de 10 L. Tanto o reciclo como a separação celular foram realizados em um sistema de fibras-ocas para microfiltração tangencial. A produção de massa seca foi 3 vezes maior no cultivo contínuo com reciclo do que nos processos descontínuo e descontínuo alimentado, alcançando produtividade volumétrica de biomassa de 1,23 g/L.h, o que representa aumento de pelo menos 4 vezes no número estimado de doses produzidas por lote em relação ao processo anteriormente desenvolvido no Instituto Butantan. As vacinas obtidas através dos diferentes processos de cultivo e separação celular foram utilizadas para imunização de camundongos e induziram níveis comparáveis de IgG anti-WCV e IL-17A. Os soros dos animais imunizados também foram avaliados em ensaios *in vitro* por citometria de fluxo, que demonstraram a ligação de anticorpos em diversas cepas encapsuladas de pneumococo e a deposição de moléculas do sistema complemento sobre a superfície de cepas do sorotipo 3. Além disso, anticorpos presentes no soro dos animais imunizados foram capazes de induzir a fagocitose de diversas cepas encapsuladas em ensaios de opsonofagocitose. Camundongos imunizados com estas preparações vacinais foram igualmente protegidos em ensaios de desafio de morte causada por sepse após aspiração da cepa pneumocócica virulenta WU2. Portanto, o processo contínuo com reciclo produziu maior número de doses sem alterar a qualidade da vacina, podendo ser empregado para produção em larga escala, e o ensaio de opsonofagocitose estabelecido tem potencial para ser utilizado como correlato de proteção da vacina celular pneumocócica.

Palavras-chave: Pneumococo. Vacina celular pneumocócica. Cultivo contínuo com reciclo de células. Avaliação imunológica da vacina. Ensaio de opsonofagocitose.

ABSTRACT

Campos IB. Optimization of the production process and characterization of *Streptococcus pneumoniae* whole cell vaccine. [Ph. D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

In recent years, several groups have concentrated efforts in the development of new vaccines against *Streptococcus pneumoniae*, since the current vaccines present some problems: they do not induce an immune response with more comprehensive coverage against more than 90 serotypes, leading to the replacement of serotypes in the vaccinated population; the vaccines are produced using serotypes prevalent in the U.S. and Europe, which generally represents a smaller coverage in other countries; they are based on capsular polysaccharides, which are relatively inexpensive to obtain, however the polysaccharides must be conjugated with carrier proteins to be effective in children; the use of conjugate vaccines in developing countries is limited due to the cost for conjugation, which is extremely high. A vaccine based on inactivated whole cell unencapsulated bacteria could solve the problems of the current vaccines, because it would induce an immune response independent of serotypes and based on the entire set of proteins of this pathogen. Furthermore, this vaccine would be inexpensive, since purification steps of polysaccharides and proteins and conjugation reactions between each individual polysaccharide and protein, as in the case of commercial vaccines, would not be required. A production process of this vaccine was developed at the Butantan Institute, using a simple batch strategy, which produces lower biomass than other fermentation processes available. Therefore, to optimize the production process and increase biomass production, batch, fed-batch and continuous cultivation with cell recycle were evaluated using 10 L bioreactor. A hollow-fiber system for tangential microfiltration was used during the cell recycle as well as to separate the cells from fermented broth. The biomass production was three fold higher in continuous cultivation with cell recycle than in batch or fed-batch processes, reaching biomass volumetric productivity of 1.23 g/L.h, which would represent at least 4 fold higher vaccine doses production per cultivation than in the former developed process at Butantan Institute. Vaccines obtained using different methods of cultivation and cell separation was used to immunize mice and induced comparable levels of anti-WCV IgG and IL-17A. Sera from immunized animals were also evaluated *in vitro* using flow cytometry that showed the binding of antibodies to the surface of different encapsulated pneumococcal strains as well as the deposition of proteins from the complement system on the surface of serotype 3 strains. Furthermore, antibodies from immunized animals were able to induce phagocytosis of several encapsulated pneumococcal strains in opsonophagocytic assays. Mice immunized with these vaccine preparations were equally protected from challenge in a model of fatal aspiration-sepsis using the virulent pneumococcal strain WU2. In conclusion, the continuous process with cell recycle produced the highest number of doses without altering the quality of the vaccine, so it could be adopted as fermentation strategy for large scale production of the vaccine, and the established opsonophagocytic assay should be further investigated as a potential correlate of protection for the pneumococcal whole cell vaccine.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Pneumococcal whole cell vaccine. Continuous fermentation with cell recycle. Immunological evaluation of the vaccine. Opsonophagocytic assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da parede celular de <i>Streptococcus pneumoniae</i> e as proteínas associadas.	28
Figura 2 – Representação da localização de alguns dos fatores de virulência do pneumococo.....	29
Figura 3 – Esquema da via proposta para o metabolismo da glicose em <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
Figura 4 – Mapa com a distribuição dos casos de pneumonia em crianças menores de 5 anos no ano de 2000.....	35
Figura 5 – Esquema do processo contínuo com reciclo de células	50
Figura 6 – Esquema de um citômetro de fluxo.....	55
Figura 7 – Esquema do processo contínuo com reciclo de células	64
Figura 8 – Sequência de tratamentos com agentes químicos e físicos e nome das amostras geradas.	81
Figura 9 – Crescimento celular, concentração de glicose residual, produção de lactato e acetato nos cultivos descontínuos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200. Média e desvio padrão dos dados de 6 experimentos.	83
Figura 10 – Ln (DO) em função do tempo de todos os cultivos descontínuos	85
Figura 11 – Microscopia óptica de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200 em diferentes instantes do cultivo descontínuo após coloração de Gram.	85
Figura 12 – Valores médios de UFC de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200 em função da DO de 5 cultivos descontínuos.	86
Figura 13 – Crescimento celular, concentração de glicose residual, produção de lactato e acetato nos cultivos descontínuos alimentados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200. Média e desvio padrão dos dados de 7 experimentos.....	87
Figura 14 – Ln (DO) em função do tempo de todos os cultivos descontínuos alimentados ...	88
Figura 15 – Microscopia óptica de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200 em diferentes instantes do cultivo descontínuo alimentado após coloração de Gram.	89
Figura 16 – Valores médios de UFC de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200 de 6 cultivos descontínuos alimentados.	89
Figura 17 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 1 de cultivo contínuo com reciclo de células de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.....	91

Figura 18 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 2 de cultivo contínuo com reciclo de células de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.....	93
Figura 19 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 3 de cultivo contínuo com reciclo de células de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.....	95
Figura 20 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 4 de cultivo contínuo com reciclo de células de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200. Média e desvio padrão dos dados de 3 experimentos.	98
Figura 21 – Valores médios de UFC de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200 referentes aos 3 cultivos do processo contínuo com reciclo de células condição 4.	100
Figura 22 – Ln (DO) em função do tempo de todos os cultivos do processo contínuo com reciclo de células	101
Figura 23 – Concentração de lactato, acetato e glicose no meio de cultura presente no reator e no permeado do sistema de microfiltração tangencial da condição 4 do cultivo contínuo com reciclo de células, lote F0708.	102
Figura 24 – Consumo total de glicose, produção total de lactato, acetato e massa seca e avaliação da DO nas 4 condições do processo contínuo com reciclo de células para cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.....	102
Figura 25 – Comparação da DO, da quantidade total de massa seca produzida e de glicose consumida em função do tempo de cultivo e curva da massa seca produzida em função da glicose consumida nos 3 processos fermentativos realizados para cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.	106
Figura 26 – Comparação da produção de acetato (A) e lactato (B) em função do tempo, da glicose consumida e da massa seca total produzida para os 3 processos fermentativos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.....	108
Figura 27 – Consumo da solução de NaOH 5M em função do tempo para os 3 processos fermentativos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.....	109
Figura 28 – Comparação da produção de formiato em função do tempo para os 3 processos fermentativos (A) e para as diferentes condições do processo contínuo com reciclo de células (B) realizadas para a bactéria <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.	110
Figura 29 – Correlação entre massa seca e DO dos 3 processos fermentativos realizados para <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.....	111

Figura 30 – FSC, SSC e ln (DO) em função do tempo dos cultivos do processo descontínuo de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.	117
Figura 31 – FSC, SSC e ln (DO) em função do tempo dos cultivos do processo descontínuo alimentado de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.	118
Figura 32 – Comparação do tamanho (FSC) e da complexidade (SSC) entre as células de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200 do processo descontínuo e descontínuo alimentado.	119
Figura 33 – Comparação das metodologias de separação celular realizadas após cultivo descontínuo alimentado até DO máx. e posterior inativação com BPL de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200 por microscopia óptica.	122
Figura 34 – Estimativa das porcentagens de recuperação das células após a microfiltração tangencial para todos os lotes submetidos a esta metodologia utilizada para o preparo do produto final.	123
Figura 35 – Comparação da DO, concentração de glicose, lactato e acetato dos produtos finais após a inativação das células de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.	124
Figura 36 – Avaliação por Western blot de proteínas específicas presentes nos diferentes lotes da vacina celular pneumocócica proveniente de diferentes processos fermentativos. ..	130
Figura 37 – Avaliação por Western blot do perfil de todas as proteínas obtidas nos diferentes lotes da vacina celular pneumocócica proveniente de diferentes processos fermentativos. ..	131
Figura 38 – Avaliação de anticorpos do tipo IgG induzidos pelas vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos.	133
Figura 39 – Avaliação de anticorpos do tipo IgG induzidos pelas vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos, utilizando diferentes metodologias de coleta de células e armazenadas em diferentes temperaturas.	134
Figura 40 – Avaliação dos níveis de IL-17A obtidos no ensaio de estimulação <i>in vitro</i> a partir do sangue dos animais imunizados com as vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos.	136
Figura 41 – Avaliação dos níveis de IL-17A obtidos no ensaio de estimulação <i>in vitro</i> a partir do sangue dos animais imunizados com as vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos, com diferentes metodologias de separação celular e armazenadas em diferentes temperaturas.	137
Figura 42 – Ensaio de ligação de anticorpos anti-WCV a <i>Streptococcus pneumoniae</i> de diferentes sorotipos.	139

Figura 43 – Avaliação da deposição de moléculas C3 sobre a superfície de <i>S. pneumoniae</i> cepa A66.1, sorotipo 3, na presença de soro anti-WCV dos grupos imunizados com diferentes preparações vacinais.	141
Figura 44 – Avaliação da deposição de moléculas C3 sobre a superfície de <i>S. pneumoniae</i> cepa WU2, sorotipo 3, na presença de soro anti-WCV dos grupos imunizados com diferentes preparações vacinais.	142
Figura 45 – Avaliação da indução de opsonofagocitose na presença de soro anti-WCV e moléculas do sistema complemento (grupo 1), para diferentes cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	147
Figura 46 – Avaliação da indução de opsonofagocitose na presença de soro anti-WCV e IL-17A (grupo 2), para diferentes cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	149
Figura 47 – Avaliação da indução de opsonofagocitose na presença de soro anti-WCV e moléculas do sistema complemento e IL-17A (grupo 3), para diferentes cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	151
Figura 48 – Avaliação da sobrevivência, após desafio intranasal, dos animais imunizados com as vacinas produzidas por diferentes processos fermentativos.	154
Figura 49 – Avaliação da sobrevivência, após desafio intranasal, dos animais imunizados com as vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos, com diferentes metodologias de separação celular e armazenadas em diferentes temperaturas.	155
Figura 50 – Avaliação de proteínas presentes no lote F2407 da vacina celular pneumocócica após tratamentos físicos e químicos.	157
Figura 51 – Avaliação de proteínas presentes no lote F2407 da vacina celular pneumocócica após tratamentos físicos e químicos que foram utilizadas nos ensaios imunológicos.	158
Figura 52 – Avaliação da estabilidade da vacina celular pneumocócica, lote F2407, a agentes químicos e físicos.	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio de cultura inicial EHS	58
Tabela 2 – Composição da solução de sais.....	58
Tabela 3 – Alteração da concentração de componentes para os meios de cultura utilizados na alimentação	59
Tabela 4 – Composição do tampão Ringer-lactato.....	59
Tabela 5 – Composição do meio BHI-ágar sangue	60
Tabela 6 – Composição do PBS	60
Tabela 7 – Resumo das condições utilizadas para o processo contínuo com reciclo de células	66
Tabela 8 – Cálculo dos parâmetros cinéticos	68
Tabela 9 – Cálculo da produtividade de células e de lactato e do número hipotético de doses.....	69
Tabela 10 – Anticorpos utilizados em Western blot contra os seguintes antígenos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> e as respectivas diluições de cada um deles.	73
Tabela 11 – Lista dos cultivos cujos produtos finais foram avaliadas em ensaios de imunização.....	74
Tabela 12 – Cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> utilizadas nos ensaios imunológicos	77
Tabela 13 – Ensaios de opsonofagocitose realizados.	79
Tabela 14 – Comparação dos processos realizados para cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200. Média dos valores de $\mu_{\text{máx.}}$, DO máx., $X_{\text{máx.}}$, UFC máx. e das concentrações de acetato, lactato e glicose no reator no instante de DO máx.	103
Tabela 15 – Valores médios obtidos para a produção total de massa seca, acetato e lactato, para os parâmetros cinéticos e produtividades referente os 3 processos fermentativos realizados para cultivo de <i>S. pneumoniae</i> cepa RM200.	113
Tabela 16 – Resultados dos ensaios de controle de qualidade dos produtos finais provenientes de diferentes processos fermentativos, após microfiltração tangencial e inativação das células de <i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa RM200.	125
Tabela 17 – Estimativa do volume do produto final, número de doses da vacina, custo com os principais nutrientes e tempo de processo para produção da vacina celular pneumocócica em escala de 10L utilizando diferentes processos.	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – anticorpo

Abs – absorbância

acet – acetato

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

Alum – adjuvante hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$)

ANOVA – análise de variância

Anti-WCV – anticorpos contra a vacina celular pneumocócica

Asn – asparagina

Asp – ácido aspártico

ATP – Adenosina trifosfato

BD – do inglês *Becton, Dickinson and Company*

BHI – do inglês *brain and heart infusion* para o preparo de meio de cultura

Bis-Tris – (2-hidroxietil) imino-tris(hidroximetil)metano-HCl

BPF – boas práticas de fabricação

BPL – β -propiolactona

BSA – do inglês *bovine serum albumin*

C3 – molécula do sistema complemento

CBP – do inglês *choline binding proteins*

CD4^+ – do inglês *cluster of differentiation 4*, típico marcador de linfócito T auxiliar

CDC – do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*

cGMP – do inglês *current good manufacturing practices*

ConA – Concanavalina A de *Canavalia ensiformis*

CRM197 – do inglês *cross-reactive mutant of diphtheria toxin*

CT – toxina colérica

Cys – cisteína

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

EHS – do inglês *enzymatically hydrolyzed soybean meal*

ELISA – do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

Eq. – equação

FACS – do inglês *fluorescence activated cell sorting*

Fc – fragmento cristalizável da imunoglobulina

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FSC – do inglês *forward scatter* (dispersão da luz correspondente ao tamanho celular)

Gly – glicina

HBSS – do inglês *Hank's Balanced Salt Solution* com cálcio e magnésio

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HPLC – do inglês *high performance liquid chromatography*

HRP – do inglês *horseradish peroxidase*

IACUC – do inglês *Institutional Animal Care and Use Committee*

IgG – imunoglobulina G

IFN- γ – interferon gama

IL-4 – interleucina 4

IL-17A – interleucina 17A

Inc. – do inglês *incorporation*

IPD – doenças pneumocócicas invasivas

LAB – bactérias ácido-láticas

lac – lactato

LctO – enzima lactato oxidase

Ldh – enzima lactato desidrogenase

LDS – tampão de amostra contendo dodecil sulfato de lítio

LTA – ácido lipoteicóico

máx. – máxima

mAU/ μ L – do inglês *Anson unit*, onde uma unidade é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de tirosina de caseína por minuto a 37 °C, pH 7,5

MES – ácido-2-(N- morfolino) etanosulfônico

MHC-II – complexo principal de histocompatibilidade classe 2

NA – não aplicável

NCBI – do inglês *Nacional Center for Biotechnology Information*

NIH – do inglês *National Institutes of Health* nos EUA

OPA – do inglês *opsonophagocytic assay*

OPS – do espanhol *Organización Panamericana de la Salud*

PBS – salina tamponada com fosfato

PBS-BSA – PBS adicionado de albumina bovina

PBS-T – PBS adicionado de Tween

PBST-milk – PBS-T adicionado de leite desnatado

PC – fosforilcolina

PCV – vacina pneumocócica conjugada

PCV7 – vacina pneumocócica conjugada 7 valente

PCV10 – vacina pneumocócica conjugada 10 valente

PCV13 – vacina pneumocócica conjugada 13 valente

PdT – pneumolisina geneticamente destoxificada

Phe – fenilalanina

Pfl – enzima piruvato formiato liase

Ply – pneumolisina

PPG – polipropileno glicol

PppA – do inglês *pneumococcal protective protein A*

PspA – do inglês *pneumococcal surface protein A*

PVDF – fluoreto de polivinilideno

R – coeficiente de correlação

RM200 – cepa acapsulada de pneumococo utilizada na produção das vacinas deste trabalho

rpm – rotação por minuto

SDS-PAGE – do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

sp. – espécie

SpxB – enzima piruvato oxidase

SSC – do inglês *side scatter* (dispersão lateral da luz correspondente à complexidade celular)

subsp. – subespécie

TA – ácido teicóico

TLR4 – do inglês *toll-like receptor 4*

Th1 – linfócitos T auxiliares subtipo 1

Th2 - linfócitos T auxiliares subtipo 2

Th17 – linfócitos T auxiliares subtipo 17

THY – meio de cultura Todd-Hewitt suplementado com extrato de levedura

TMB – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

Trp – triptofano

TSA – do inglês *tryptic soy agar*

UE – unidades endotóxicas

UFC – unidade formadora de colônia

USP – do inglês *United States Pharmacopeial Convention Inc.*

UV-Vis – luz ultra violeta e luz visível

vvm – volume de ar por volume de líquido no reator por minuto

WAVE – do inglês *World Association for Vaccine Education*

WCA – do inglês *whole cell antigen* (produto final sem adsorção do adjuvante)

WCV – do inglês *whole cell vaccine* (produto final diluído adsorvido ao adjuvante)

WHO – do inglês *World Health Organization*

WU2 – cepa virulenta da bactéria *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 3

LISTA DE SÍMBOLOS

- μ – velocidade específica de crescimento (h^{-1})
- $\mu_{\text{máx.}}$ – velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
- a – fração da vazão do líquido efluente que é reciclada
- acet_{total} – total de acetato produzido (g)
- B – razão de “purga” ou do inglês *bleeding*
- D – vazão específica de alimentação ou taxa de diluição (h^{-1})
- D_c – D crítico
- F – vazão de alimentação (L/h)
- F_s - vazão de saída do líquido efluente
- g - fator relativo ao incremento da concentração celular obtido no separador
- lac₀ – concentração de lactato no início do cultivo (g/L)
- lac_{máx.} - concentração de lactato máxima no biorreator (g/L)
- lac_{total} – total de lactato produzido (g)
- P_{lac} – produtividade volumétrica de lactato ($\text{g}_{\text{lactato}}/\text{L.h}$)
- P_X – produtividade volumétrica de células ($\text{g}_{\text{massa seca}}/\text{L.h}$)
- S – concentração de substrato limitante no meio de cultura no reator (g/L)
- S_e – concentração do substrato limitante no meio de alimentação (g/L)
- S_{total} – glicose total consumida (g)
- t – tempo de cultivo (h)
- t_0 – tempo inicial de cultivo (h)
- V – volume de meio no reator (L)
- V_0 – volume presente no biorreator antes do início do cultivo (L)
- V_{alim} – volume utilizado na alimentação e reposição de meio de cultura (L)
- V_{conc} – volume do produto concentrado após etapas de concentração e lavagem (L)
- V_{cult} – volume teórico do reator + V_{fibra} (L)
- V_{fibra} – volume presente no sistema de fibras-ocas e mangueiras (L)
- V_{pf} – volume estimado para o produto final (L)
- V_{retirado} – volume retirado nas amostragens e na fase de concentração das células (L)
- V_{sist} – volume de meio de cultura do sistema (L)
- X – concentração de biomassa medida pela técnica de massa seca em um dado instante (g/L)
- X_0 – biomassa no reator no instante zero do cultivo (g/L)
- $X_{\text{máx.}}$ – concentração máxima de biomassa no reator (g/L)

X_{total} – biomassa total produzida (g)

$Y_{\text{acet/S}}$ – fator de conversão de glicose à acetato ($\text{g}_{\text{acetato}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)

$Y_{\text{lac/S}}$ – fator de conversão de glicose à lactato ($\text{g}_{\text{lactato}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)

$Y_{\text{lac/X}}$ – produção de lactato por grama de célula ($\text{g}_{\text{lactato}}/\text{g}_{\text{massa seca}}$)

$Y_{\text{P/S}}$ – fator de conversão de substrato à produto ($\text{g}_{\text{ácidos}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)

$Y_{\text{X/S}}$ – fator de conversão de glicose à biomassa ($\text{g}_{\text{massa seca}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)

LISTA DE EQUAÇÕES

Número	Equação	Página
Eq. 1	$F_s = (1-c)F + cF + aF_s$	51
Eq. 2	$F_s = F / (1-a)$	51
Eq. 3	$V \frac{dX}{dt} = V\mu X + aF_s \cdot gX - F_s X$	51
Eq. 4	$D = F / V$	51
Eq. 5	$\frac{dX}{dt} = \left\{ \mu - \left[D \cdot \left(\frac{1-ag}{1-a} \right) \right] \right\} \cdot X$	51
Eq. 6	$B = \frac{(1-ag)}{(1-a)}$	51
Eq. 7	$\frac{dX}{dt} = (\mu - BD) \cdot X$	52
Eq. 8	$\mu = BD$	52
Eq. 9	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$	52
Eq. 10	$D = \frac{F}{V_{cult}}$	66
Eq. 11	$V_0 + V_{alim} + V_{fibra} - V_{retirado}$	68
Eq. 12	$\frac{acet_{total}}{S_{total}}$	68
Eq. 13	$\frac{X_{m\acute{a}x.} - X_0}{t - t_0}$	69
Eq. 14	$\frac{lac_{m\acute{a}x.} - lac_0}{t - t_0}$	69
Eq. 15	$lac_{m\acute{a}x.} \cdot D$	69
Eq. 16	$\frac{Conc. proteica \cdot Vol. produto final}{0,3 (mg) prote\acute{i}na por dose}$	69
Eq. 17	$\frac{(DO_{produto\ final} \cdot V_{pf})}{(DO_{final\ do\ cultivo} \cdot V_{sist})} \cdot 100 = \% \text{ rendimento}$	71
Eq. 18	$V_{pf} = V_{conc} + V_{fibra}$	71
Eq. 19	$V_{pf} = \frac{V_{sist} \cdot DO_{final\ do\ cultivo}}{DO_{produto\ final}}$	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Objetivos.....	25
1.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	O pneumococo.....	26
2.1.1	<i>O metabolismo</i>	29
2.2	Doenças pneumocócicas	33
2.2.1	<i>Epidemiologia</i>	34
2.3	As vacinas	35
2.3.1	<i>Uma velha abordagem para os novos problemas</i>	37
2.3.2	<i>Desenvolvimento da vacina pneumocócica celular</i>	41
2.4	Estratégias de cultivo em biorreator.....	43
2.4.1	<i>Processo descontínuo.....</i>	44
2.4.2	<i>Processo descontínuo alimentado</i>	45
2.4.3	<i>Processo contínuo</i>	47
2.4.4	<i>Equacionamento do processo contínuo com reciclo de células</i>	50
2.5	O uso da citometria de fluxo em bioprocessos	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Linhagem.....	57
3.2	Meios de cultura e soluções.....	57
3.2.1	<i>Meios de cultura utilizados nos cultivos</i>	57
3.2.2	<i>Outros meios de culturas e soluções diversas</i>	59
3.3	Preparo do banco de células	62
3.4	Cultivos em biorreator	62
3.4.1	<i>Processo descontínuo.....</i>	63

3.4.2	<i>Processo descontínuo alimentado</i>	63
3.4.3	<i>Processo contínuo com reciclo de células</i>	63
3.4.3.1	<u>Diferentes condições de cultivo para o processo contínuo</u>	65
3.5	<i>Análises das amostras dos processos fermentativos</i>	66
3.6	<i>Cálculos dos parâmetros cinéticos</i>	68
3.6.1	<i>Análises estatísticas dos cultivos</i>	70
3.7	<i>Separação celular e preparo do produto final</i>	70
3.8	<i>Controle de qualidade do produto final</i>	72
3.9	<i>Western blot</i>	72
3.10	<i>Ensaio de imunização de camundongos</i>	74
3.11	<i>Estimulação <i>in vitro</i> das células sanguíneas</i>	75
3.12	<i>ELISA para anticorpos IgG</i>	75
3.13	<i>ELISA para IL-17A</i>	76
3.14	<i>Ensaio de ligação de anticorpos</i>	77
3.15	<i>Ensaio de deposição de complemento</i>	78
3.16	<i>Ensaio de opsonofagocitose</i>	78
3.17	<i>Preparação da cepa e ensaio de desafio de camundongos</i>	80
3.18	<i>Avaliação da estabilidade do produto final</i>	80
3.19	<i>Análise estatística dos ensaios imunológicos</i>	82
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1	<i>Processo descontínuo</i>	83
4.2	<i>Processo descontínuo alimentado</i>	86
4.3	<i>Processo contínuo com reciclo de células</i>	90
4.3.1	<i>Condição 1 para o processo contínuo com reciclo</i>	90
4.3.2	<i>Condição 2 para o processo contínuo com reciclo</i>	92
4.3.3	<i>Condição 3 para o processo contínuo com reciclo</i>	94
4.3.4	<i>Condição 4 para o processo contínuo com reciclo</i>	96

4.3.5	<i>Comparação entre os cultivos do processo contínuo com reciclo</i>	100
4.4	Comparação entre todos os processos realizados	103
4.4.1	<i>Produção de biomassa</i>	103
4.4.2	<i>Produção de ácidos orgânicos</i>	106
4.4.3	<i>Relação entre massa seca e DO</i>	110
4.4.4	<i>Análise estatística dos parâmetros obtidos nos diferentes processos</i>	112
4.5	Avaliação da morfologia das células por citometria de fluxo	116
4.6	Separação celular e avaliação do produto final	120
4.7	Avaliação econômica das vacinas	126
4.8	Análise do perfil de proteínas	129
4.9	Avaliação imunológica das vacinas produzidas	131
4.9.1	<i>Avaliação da resposta humoral</i>	132
4.9.2	<i>Avaliação da resposta celular - Produção de IL-17A</i>	135
4.10	Ensaio de ligação de anticorpos e deposição de complemento	138
4.11	Ensaio de opsonofagocitose	144
4.12	Ensaio de desafio	153
4.13	Avaliação da estabilidade do produto final	155
5	CONCLUSÕES	163
	REFERÊNCIAS	167
	APÊNDICE A – Resumo dos cultivos realizados neste trabalho	181
	APÊNDICE B – Comparação dos cultivos descontínuos realizados em 60 L e em 10 L	182
	APÊNDICE C – Análise no software AnaBio	183
	APÊNDICE D – Artigo de periódico	184

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae (pneumococo), uma bactéria que normalmente coloniza o trato respiratório superior de humanos, pode causar doenças como pneumonia, bacteremia, meningite, ou infecções locais como otite média aguda e sinusite. Entre as 8,8 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos no mundo no ano de 2008, foram estimadas cerca de 470 mil causadas por infecções pneumocócicas (World Health Organization - WHO, 2012).

Esta bactéria possui uma cápsula polissacarídica que a diferencia em mais de noventa sorotipos, sendo este o principal componente utilizado na produção das vacinas atualmente comercializadas. Devido ao seu alto custo de produção, que inclui purificação dos polissacarídeos, conjugação com proteínas, e purificação dos conjugados, essas vacinas tornam-se inviáveis para aplicação nas regiões de maior incidência. Além disso, elas induzem resposta sorotipo-dependente, sem proteção cruzada contra todos os sorotipos existentes, e são formuladas com os sorotipos prevalentes nos EUA e na Europa, o que limita a cobertura para as cepas prevalentes nos demais países. Inclusive no Brasil, onde a cobertura foi estimada em 72% para a vacina 13-valente e em 59% para a vacina 10-valente (Franco et al., 2010), enquanto que Andrade et al. (2014) apresentaram resultados de cobertura de 53% e 35% para as vacinas 13-valente e 10-valente, respectivamente.

Por essas razões, Malley et al. (2001) propuseram um modelo de imunização intranasal com uma cepa sem cápsula e inativada com etanol, a qual impediu a colonização de pneumococo encapsulado na nasofaringe e a doença invasiva em ensaios de desafio em camundongos. Esta estratégia resultaria em uma vacina de menor custo de produção e com cobertura independente de sorotipos, pois seria baseada em antígenos comuns a todos os sorotipos. Além disso, o mesmo grupo verificou que a proteção de camundongos contra colonização do pneumococo na nasofaringe foi independente de anticorpos e dependente da resposta por células do tipo Th17, via produção da interleucina 17A (IL-17A) (Lu et al., 2008).

Visando à produção em larga escala dessa vacina, o Instituto Butantan, em parceria com Boston Children's Hospital e a organização PATH, desenvolveu um meio de cultura livre de componentes de origem animal, que atende as regulamentações para produtos humanos (Liberman et al., 2008). Também desenvolveu a metodologia para produção da vacina em escala piloto (Gonçalves et al., 2014), que consistiu em um processo descontínuo, com coleta das células no final da fase logarítmica de crescimento utilizando um sistema de

microfiltração tangencial de fibras-ocas e inativação da suspensão celular com β -propiolactona (BPL).

Apesar do sucesso dessa iniciativa, novos estudos ainda se fazem necessários na tentativa de aumentar a concentração celular, sem perda da qualidade do produto, ou seja, sem que as bactérias inativadas percam sua imunogenicidade. Portanto, o intuito deste trabalho foi aumentar a produção de massa celular utilizando diferentes estratégias de cultivo: processo descontínuo até que a suspensão celular atingisse densidade óptica (DO) máxima; processo descontínuo alimentado; e o processo contínuo com reciclo de células. Então, as diferentes vacinas produzidas neste trabalho foram avaliadas em ensaios imunológicos previamente padronizados com a vacina desenvolvida em escala piloto. Por fim, outras metodologias para avaliação imunológica da vacina foram testadas, a fim de propor novos ensaios que poderiam ser utilizados para controle de qualidade da vacina.

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar diferentes estratégias de cultivo da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, a fim de aumentar a concentração de biomassa, sem comprometimento da qualidade da vacina celular pneumocócica obtida.

1.1.1 Objetivos específicos

- Comparação das estratégias de cultivo: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células;
- Coleta das células nas fases exponencial e estacionária de crescimento, utilizando as metodologias de centrifugação e microfiltração tangencial, a fim de avaliar o impacto da separação celular na qualidade da vacina;
- Avaliação das vacinas produzidas nas diferentes condições de cultivo e separação celular quanto à capacidade de induzir resposta imune em camundongos e proteção em ensaios de desafio em comparação com a vacina controle produzida em escala piloto;
- Estudo de outros ensaios imunológicos que poderiam ser utilizados para controle de qualidade da vacina celular pneumocócica e potencialmente como correlatos de proteção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O pneumococo

A bactéria *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) foi descrita pela primeira vez em 1881 por dois microbiologistas, Louis Pasteur na França e George Sternberg nos EUA, como um diplococo de formato lanceolado que após isolamento da saliva humana foi recuperado do sangue de coelhos depois da inoculação nestes animais, sendo, portanto os primeiros a detectar também seu potencial patogênico. Na mesma época, Christian Gram identificou essa bactéria em tecidos de pulmão de pacientes que morreram de pneumonia empregando a técnica de coloração que posteriormente desenvolveu para identificação de bactérias de importância clínica, sendo então classificada como pertencente ao grupo de Gram-positivas. Até 1974 foi denominada *Diplococcus pneumoniae*, quando recebeu seu nome atual por formar cadeias características de estreptococos nos cultivos em meio líquido (Watson et al., 1993). Ela possui propriedades como a susceptibilidade à optoquina e a solubilidade em bile, dentre outras, que são utilizadas até hoje em testes de identificação, porém a existência de isolados atípicos mostra que nem sempre o uso das metodologias convencionais de identificação é suficiente (Chandler et al., 2000; Kaijalainen et al., 2002). Outra característica utilizada para identificar o pneumococo, juntamente com as previamente descritas, é a exibição de colônias do tipo α -hemolíticas em meio ágar-sangue após cultivo em aerobiose, formando um halo esverdeado devido à hemólise parcial causada pela atividade do peróxido de hidrogênio formado ou da hemolisina conhecida como pneumolisina (Ply). No entanto, quando o pneumococo é cultivado em anaerobiose, portanto sem formação de peróxido de hidrogênio, as colônias exibem um halo β -hemolítico (Lorian, Popoola, 1972). Estudos posteriores com uma cepa geneticamente modificada que não possuía o gene para produção de Ply mostraram que a β -hemólise não foi dependente desta proteína (Canvin et al., 1997). Como os halos β -hemolíticos só foram observados após cultivos em placas por 24 horas a 37 °C e posterior incubação das mesmas placas por 48 horas a 6 °C, esta observação poderia ser decorrência de subprodutos de lise bacteriana devido ao cultivo estendido, tal como observado em placas com o antibiótico meticilina, que causou danos às bactérias e aumentou a produção de β -hemólise (Lorian et al., 1973).

O pneumococo está normalmente envolto por uma cápsula polissacarídica que o diferencia em pelo menos 94 sorotipos (Calix et al., 2012; Song et al., 2013). Com base na

cápsula, em meados de 1910, Griffith determinou o princípio da transformação quando injetou em camundongos o pneumococo encapsulado morto juntamente com outra cepa viva, porém não encapsulada, e foram recuperadas apenas bactérias encapsuladas (AlonsoDeVelasco et al., 1995). A cápsula consiste basicamente de polímeros de alto peso molecular constituídos de unidades repetidas de oligossacarídeos (AlonsoDeVelasco et al., 1995). Em meados de 1920, Heidelberger e colaboradores do Instituto Rockefeller demonstraram pela primeira vez que estes carboidratos que cobrem o pneumococo eram antigênicos, pois induziram a proteção de camundongos contra infecção letal após o ensaio de desafio (Watson et al., 1993). Este trabalho foi pioneiro pois até então acreditava-se que apenas proteínas eram capazes de induzir resposta imune, portanto este foi o primeiro antígeno não proteico descoberto. Além disso, o mesmo grupo identificou que a cápsula polissacarídica era o fator responsável pela reatividade no ensaio para identificação dos sorotipos, que ela protegia o pneumococo da fagocitose e que anticorpos anticápsula conferiam proteção sorotipo-específica (Malley, Anderson, 2012).

Variações na espessura da cápsula ocasionam variações na morfologia da colônia quanto à opacidade, sendo que estas variações estão ligadas também à patogenicidade. Bactérias provenientes de colônias transparentes foram capazes de colonizar a nasofaringe em estudos em modelo animal (Weiser et al., 1994, 1996) e foram mais aderentes a células endoteliais humanas em cultura (Cundell et al., 1995), enquanto que bactérias oriundas de colônias opacas, em ambos os estudos, foram ineficientes ou apresentaram capacidade reduzida. Bactérias de colônias transparentes possuem cápsula fina e parede celular mais espessa, o que permitiria maior interação de moléculas subcapsulares com as células do hospedeiro, facilitando então a adesão (Kim, Weiser, 1998). Já as colônias opacas, que apresentam bactérias com parede celular mais fina e cápsula mais espessa do que as bactérias presentes em colônias transparentes, foram mais virulentas quando inoculadas em ratos, cuja taxa de sobrevivência foi menor do que a dos animais inoculados com bactérias de colônias transparentes (Kim, Weiser, 1998). Além disso, foi demonstrada maior quantidade de colônias opacas recuperadas do homogeneizado do tecido nasal previamente lavado, evidenciando que essas colônias foram capazes de invadir o tecido, além de provocar inflamação aguda na mucosa e submucosa e infiltração de células inflamatórias (Briles et al., 2005).

O pneumococo possui parede celular composta de peptidoglicanos que estão ligados covalentemente a glicopolímeros de açúcares complexos, chamados de ácido teicóico (TA), e à cápsula polissacarídica, além da presença do ácido lipoteicóico (LTA) que está conectado à membrana lipídica. Geralmente, LTA são polímeros formados por unidades repetidas de

glicerol-fosfato, porém *S. pneumoniae*, diferentemente de outras bactérias Gram-positivas, possuem a porção glicídica de LTA idêntica ao TA (Weidenmaier, Peschel 2008). Ligado a ambos TA e LTA, estão os resíduos de fosforilcolina (PC), outra peculiaridade do pneumococo, sendo que o número destes resíduos pode variar (Hakenbeck et al., 2009). A PC serve como sítio para ligação, de maneira não covalente, de 10 a 15 proteínas que apresentam o domínio de ligação à colina (CBP), como esquematizado na Figura 1, além de ter função de adesina, pois é reconhecida pelo receptor do fator de agregação plaquetária das células do hospedeiro, dentre outras funções (Bergmann, Hammerschmidt, 2006; Weidenmaier, Peschel 2008). A parede celular também é considerada como um fator de virulência devido ao efeito inflamatório que pode causar como a ativação do sistema complemento, aumento da permeabilidade vascular, degranulação, ativação de células polimorfonucleares e aumento da produção de IL-1 (AlonsoDeVelasco et al., 1995).

Figura 1 – Esquema da parede celular de *Streptococcus pneumoniae* e as proteínas associadas.

LM- membrana lipídica; PG- peptidoglicano; TA- ácido teicóico; LTA- ácido lipoteicóico; PC- resíduo de fosforilcolina; CBP- proteínas ligadoras de colina; LPxTG- proteínas ancoradas pelo domínio LPxTG. Fonte: Modificado de Bergmann, Hammerschmidt (2006).

Além da cápsula polissacarídica e da parede celular, outros fatores de virulência do pneumococo são amplamente estudados como: a hemolisina Ply; as CBP, como PspA, PspC e a autolisina LytA; as lipoproteínas, como PsaA; as proteínas ancoradas com domínio LPxTG (motivo de ancoramento composto pela sequência dos seguintes aminoácidos: leucina,

prolina, qualquer aminoácido, treonina e glicina) e as proteínas não clássicas que não possuem peptídeo sinal nem domínio de ancoramento à membrana. Com exceção da Ply, que está presente no meio intracelular, mas é liberada para o meio extracelular pela autólise, todos esses fatores de virulência estão de alguma maneira associados à parede celular ou à cápsula polissacarídica, conforme esquematizado na Figura 2 (Kadioglu et al., 2008). Outros possíveis fatores de virulência estão associados a genes ou produtos do metabolismo, como por exemplo, a mutação no gene *nox*, que codifica a NADH oxidase, causou diminuição na virulência em modelo de infecção sistêmica; a mutação no gene *pfl*, que codifica para enzima piruvato formiato liase, causou redução da recuperação de bactérias na nasofaringe, pulmão e sangue após ensaios de desafio em animais (Yesilkaya et al., 2009); o gene *spxB*, que codifica a enzima piruvato oxidase e tem como subproduto H_2O_2 , confere adaptação seletiva em ensaios de competição *in vitro* com outras bactérias da nasofaringe (Pericone et al., 2000) e em modelo de colonização de animais (Regev-Yochay et al., 2007).

Figura 2 – Representação da localização de alguns dos fatores de virulência do pneumococo.

Fonte: Modificado de Kadioglu et al.(2008).

2.1.1 O metabolismo

O pneumococo pertence ao grupo de bactérias ácido-láticas (LAB), que são bactérias Gram-positivas classificadas na ordem dos *Lactobacillales* e fermentativas obrigatórias, tendo como principal catabólito do metabolismo de carboidratos o lactato (Fernández, Zúniga,

2006). Trinta por cento dos sistemas transportadores do pneumococo estão teoricamente envolvidos na captura de aproximadamente 12 carboidratos diferentes, que podem ser metabolizados pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (glicólise) ou pela via pentose-fosfato (Härtel et al., 2012). A análise do genoma do pneumococo revelou a ausência dos 18 genes que codificam para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Hoskins et al., 2001), além da ausência de genes que codificam enzimas para uma via alternativa que também converte glicose a piruvato a um menor rendimento de ATP, a via de Entner-Doudoroff, e também a ausência de genes para codificar proteínas da cadeia transportadora de elétrons (Härtel et al., 2012). Portanto a obtenção de energia é estritamente via fermentação, sendo o pneumococo incapaz de realizar o metabolismo respiratório, seja sob condição de aerobiose ou anaerobiose, como visto para todas as espécies do gênero de *Streptococcus* (Hoskins et al., 2001).

Como os demais membros das LAB, o pneumococo é uma bactéria aerotolerante, ou seja, não depende de oxigênio para o metabolismo aeróbio, como já discutido, mas tolera a presença de O₂, que por sua vez ocasiona alterações no produto final do metabolismo da glicose (Taniai et al., 2008). Segundo estes autores, em condições em que a glicose está disponível, três quartos do piruvato são convertidos em lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (Ldh), resultando no metabolismo conhecido como homofermentativo, e um quarto do piruvato é convertido em acetato pela ação das enzimas piruvato oxidase (SpxB) e acetato quinase (AckA), com a aquisição de um ATP adicional e a utilização de oxigênio, o que é conhecido como metabolismo misto. A soma das concentrações molares de lactato e acetato foram o dobro da concentração molar inicial de glicose, indicando a equivalência estequiométrica da conversão de glicose nos produtos finais. O lactato pode ser oxidado de volta para piruvato pela enzima lactato oxidase (LctO) e então o piruvato pode ser convertido a acetato pela ação de SpxB. Ambas as enzimas tem como subproduto H₂O₂, conforme esquematizado na Figura 3, e são produzidas de maneira constitutiva mesmo na presença de excesso de glicose, indicando que não sofrem repressão catabólica. A expressão constitutiva destas enzimas é uma característica única do pneumococo, pois LAB possuem proteínas homólogas a estas, mas não são detectadas enquanto há glicose disponível. A presença de lactato no meio de cultura, além da glicose, aumenta a DO de cultivo, indicando a utilização do lactato para a formação adicional de ATP e, portanto, para a obtenção de maior massa celular (Taniai et al., 2008).

Figura 3 – Esquema da via proposta para o metabolismo da glicose em *Streptococcus pneumoniae*.

ABCD - proteínas putativas envolvidas no transporte; G6P - glicose 6-fosfato como produto intermediário da glicólise e também precursor da biossíntese de cápsula polissacarídica; NDP-açúcares - açúcar fosfatado sintetizado com o gasto de UTP; Pi - fosfato inorgânico; PEP - fosfoenolpiruvato; Ac-P - acetil fosfato. Em *itálico* os genes das enzimas envolvidas: *pyk* - piruvato quinase; *ldh* - lactato desidrogenase; *lctO* - lactato oxidase; *spxB* - piruvato oxidase; *ackA* - acetato quinase; *pta* - fosfotransacetilase; *nox* - NADH-oxidase; *pfl* - piruvato formiato-liase; *adh* - bifuncional acetaldeído-CoA/álcool desidrogenase; *PDHc*- complexo piruvato desidrogenase putativo (reação em cinza precisa ser comprovada). Fonte: Modificado de Carvalho et al. (2013).

Outros autores também evidenciaram a existência de metabolismo misto, desencadeado na presença de galactose, com a atividade da enzima piruvato formiato liase (Pfl), em que o piruvato é convertido em acetil-CoA com formação de formiato e acetil-CoA (Figura 3), que pode ser utilizado na produção de acetato, gerando um ATP, ou na síntese de ácidos graxos. Esta enzima é inativada em aerobiose para outros microrganismos, no entanto, os autores detectaram seu funcionamento no pneumococo tanto em aerobiose como em anaerobiose. Além disso, a ausência do gene *pfl* promoveu a redução da virulência do pneumococo e aumento da sobrevivência dos animais infectados com este mutante (Yesilkaya et al., 2009). A partir destes resultados, os autores sugeriram que este metabolismo misto ocorra

no pneumococo em ambientes hostis como a mucosa, onde a concentração de glicose é baixa, mas há mucina, polissacarídeo rico em galactose. Em contrapartida, Carvalho et al. (2013), não detectaram a produção de formiato em condições de aerobiose no cultivo das cepas D39 (encapsulada) e R6 (acapsulada), em um trabalho que detectou melhores performances de crescimento em diferentes condições para cada cepa. Este trabalho mostrou que a cepa encapsulada apresentou crescimento ótimo em cultivos semiaeróbios, enquanto que a cepa acapsulada em cultivos anaeróbios. Os cultivos aeróbios apresentaram maior atividade da enzima SpxB, haja vista a maior produção de acetato e H_2O_2 . Além disso, maior rendimento para ATP era esperado nestes cultivos, devido a maior produção de acetato, porém a biomassa obtida foi menor, talvez em decorrência do excesso de H_2O_2 , que apesar de conferir vantagens adaptativas ao pneumococo, como a inibição do crescimento de outros microrganismos num ambiente de competição rico em oxigênio como a nasofaringe (Pericone et al., 2000), H_2O_2 também pode inibir o crescimento do pneumococo, devido a ausência da enzima catalase ou de outras peroxidases.

O pneumococo é considerado um organismo fastidioso, característica comum às LAB, e por isso normalmente requer meios complexos para seu crescimento (Hoskins et al., 2001). Assim, o pneumococo não tem capacidade de síntese *de novo* de vários aminoácidos e é auxotrófico para arginina, cisteína, glicina, glutamina, histidina, e os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. A auxotrofia para estes aminoácidos foi confirmada em ensaios com meio de cultura definido na ausência de cada aminoácido, além de análises com carbono marcado, apesar de análises do genoma sugerirem que o pneumococo poderia sintetizar aminoácidos ramificados (Härtel et al., 2012). A glutamina é considerada a principal fonte de nitrogênio, devido ao grande número de genes que codificam os elementos de sete transportadores do tipo ABC para esse aminoácido, que representam 10% dos genes de transporte (Hoskins et al., 2001). Ele também é auxotrófico para colina, sendo este um nutriente não usual para bactérias. O crescimento do pneumococo na ausência de colina foi possível pela substituição deste composto por etanolamina no meio de cultura, porém isso levou a uma série de consequências: crescimento em cadeias, devido à ausência da enzima formadora do septo, portanto a bactéria não conseguia se dividir plenamente para formar diplococos; perda da capacidade de se autolisar na fase estacionária, devido à ausência da autolisina; perda da capacidade de transformação genética e da virulência (Denapate et al., 2012).

2.2 Doenças pneumocócicas

S. pneumoniae é um microrganismo que coloniza o trato respiratório superior de humanos, os quais são o único reservatório natural. Quando colonizado, o indivíduo encontra-se no estado de portador, podendo transmitir o pneumococo para outras pessoas. O estado de portador varia de acordo com o *background* genético, as condições socioeconômicas e a idade, sendo o pico de incidência aos 3 anos. Para que ocorra a colonização é requerida a aderência do pneumococo às células epiteliais do trato respiratório, o que envolve a ligação de proteínas da superfície do microrganismo aos carboidratos da superfície das células (Bogaert et al., 2004). Sorotipos de baixa imunogenicidade, como 6, 14, 19 e 23, têm maior probabilidade de colonizar a nasofaringe por um período mais longo, favorecendo a transmissão e a sobrevivência no hospedeiro, porém a baixa imunogenicidade não significa que esses sorotipos sejam menos virulentos, principalmente em indivíduos *naive* (Mehr, Wood, 2012).

A colonização é frequentemente assintomática, mas algumas vezes, pode ser seguida pelo desenvolvimento da doença. Isto ocorre quando a bactéria atinge partes normalmente estéreis do organismo do hospedeiro e então uma resposta inflamatória se inicia, resultando em doenças não invasivas como otite aguda do ouvido médio, sinusite e pneumonia, ou em doenças pneumocócicas invasivas (IPD), nas quais ocorre invasão da corrente sanguínea, provocando bacteremia, que por sua vez pode ocasionar infecções secundárias como a meningite. A pneumonia ocorre pela aspiração do pneumococo presente na nasofaringe, porém quando associada à bacteremia, a pneumonia também é classificada como IPD (Kadioglu et al., 2008; WHO, 2012). Os fatores de risco associados às IPD em crianças são: etnia, sendo a população indígena de maior risco; coinfeções virais; imunodeficiências; a pré-existência de doenças como diabetes, doença renal, dentre outras; tabagismo dos pais; período de inverno; ambientes populosos, como creches onde a taxa de transmissão é maior (Mehr, Wood, 2012). O risco também é maior para idosos > 65 anos, em pessoas que possuem hábitos de tabagismo e alcoolismo e em pessoas com doenças crônicas, especialmente doenças de coração ou pulmão, e imunodeficiências como AIDS (WHO, 2012). De maneira geral, a invasão pelo pneumococo inicia-se em um tecido inflamado, pois as moléculas inflamatórias mudam o tipo e o número de receptores das células e o pneumococo tem maior afinidade por estes receptores, por exemplo, a parede celular tem afinidade pelo receptor do fator de agregação plaquetária e a ligação dessas moléculas causa a internalização e a migração do pneumococo através do epitélio respiratório (Bogaert et al., 2004).

O tratamento das doenças pneumocócicas com penicilina tem sido realizado desde a década de 1940, no entanto, o surgimento de clones resistentes, inclusive os multidroga resistentes, tem sido notificado desde 1970, e já estão disseminados internacionalmente. A resistência à penicilina está associada a modificações estruturais na proteína ligadora de penicilina do pneumococo, sendo que estas modificações permitem a síntese de peptidoglicano apesar da presença do antibiótico (van der Poll, Opal, 2009). Por isso, a introdução das vacinas pneumocócicas teve um grande impacto na prevenção das doenças causadas por este patógeno.

2.2.1 Epidemiologia

De maneira geral, 75% dos casos de IPD e 83% das meningites pneumocócicas ocorrem em crianças menores de 2 anos de idade, sendo que as maiores taxas de mortalidade ocorrem em países em desenvolvimento (WHO, 2012). Foi estimado que 14,5 milhões de crianças no mundo contraíram doenças pneumocócicas no ano de 2000, desconsiderando otite e sinusite que normalmente não são reportadas, sendo que 95,6% dos casos foram de pneumonia, 3,7% de doenças invasivas que não fossem pneumonia ou meningite e 0,7% de meningite. Estimou-se que 826 mil crianças menores de 4 anos morreram em decorrência de doenças pneumocócicas no ano 2000, ou 735 mil mortes quando consideradas apenas crianças não portadoras do HIV, sendo que este número correspondeu a 11% do total de mortes no mundo de crianças HIV-negativas até 4 anos de idade (O'Brien et al., 2009). Constatou-se também que 95% das mortes causadas pelo pneumococo, contabilizadas no ano de 2000, ocorreram em países da África e Ásia, conforme Figura 4 (Alderson et al., 2010). No Brasil, foram observadas mais de 66 mil mortes de crianças menores de 5 anos ocorridas no ano de 2008, sendo que > 5800 foram em decorrência de pneumonia e > 900 em decorrência de meningite, o que corresponde a mais de 10% do total de casos de morte em < 5 anos (Black et al., 2010).

Figura 4 – Mapa com a distribuição dos casos de pneumonia em crianças menores de 5 anos no ano de 2000.

Fonte: Modificado de Alderson et al. (2010).

2.3 As vacinas

As vacinas contra *S. pneumoniae* atualmente comercializadas foram desenvolvidas com base na cápsula polissacarídica. Os anticorpos anticápsula conferem proteção imunológica sorotipo-específica, com pouca reatividade cruzada, sendo que esta proteção é mediada pela ligação desses anticorpos na superfície da bactéria, pois eles facilitam a deposição de moléculas do sistema complemento, causando a chamada opsonização da bactéria, o que estimula a internalização da bactéria pelas células fagocitárias, através da ligação da porção Fc dos anticorpos aos receptores dos fagócitos (Miyaji et al., 2013).

A vacina 23-valente (Pneumovax® 23, Merck), composta por polissacarídeos capsulares de 23 sorotipos diferentes, está disponível desde a década de 80, e mostrou-se protetora contra IPD para adultos e em menor extensão para idosos. Uma única dose promoveu boa resposta de anticorpos em 60-80% dos adultos saudáveis e em 62% de crianças de 2 a 5 anos de idade. Ela apresenta boa cobertura para os sorotipos existentes, cerca de 90% dos sorotipos causadores de IPD nos países desenvolvidos, mas não está claro se essa vacina protege contra pneumonia. Outro fato relevante é que a vacina 23-valente não protege contra infecções de mucosa e, portanto, não reduz a colonização da mucosa pelo pneumococo. Além

disso, alguns estudos sugerem o desenvolvimento de tolerância imunológica quando administrada repetidas vezes (WHO, 2009). Não menos importante, é o fato de que a vacina 23-valente induz resposta imune T-independente, portanto estimula células B para diferenciação em plasmócitos e produção de anticorpos, mas não gera resposta imunológica de memória. Por esta razão, essa vacina é pouco imunogênica para crianças < 2 anos, que são o grupo de risco, pois elas não possuem esse tipo de resposta imunológica bem desenvolvida (Pollard et al., 2009; WHO, 2012).

Por isso, no ano de 2000, foi licenciada nos EUA uma vacina pneumocócica conjugada (PCV) baseada em cápsulas polissacarídicas de 7 sorotipos diferentes conjugadas a uma proteína imunogênica, CRM197, que é um mutante da toxina diftérica (PCV7, Prevnar®, Wyeth/Pfizer). Diferentemente da vacina 23-valente, a imunização com PCV7 gerou resposta de anticorpos sorotipo-específica protetora e de memória em crianças < 2 anos, além do declínio de IPD causadas por sorotipos presentes na vacina. Houve também o decréscimo de casos de IPD causadas por sorotipos presentes na vacina na população não vacinada, como crianças que ainda não tinham a idade para imunização e adultos acima de 50 anos, mostrando o efeito protetor indireto da vacina, conhecido em inglês como *herd immunity*. O Centro de Controle de Doenças (CDC) nos EUA estimou que 2/3 da redução do número total de casos de IPD poderia ser atribuído a esse efeito (Moffitt, Malley, 2011). A escolha dos sorotipos da PCV7 foi realizada com base nas informações dos isolados clínicos e a maioria dos sorotipos incluídos era resistente a antibióticos β -lactâmicos. Embora a incidência de IPD causadas pelos sorotipos vacinais tenha caído após a introdução da PCV7, a prevalência de cepas resistentes a antibióticos na população pneumocócica permaneceu inalterada (Croucher et al., 2014).

Apesar de seus benefícios, a PCV7 apresenta cobertura limitada de apenas 49%, em média, para todos os sorotipos causadores de IPD no mundo, porém esta cobertura é mais alta, 82%, quando avaliada apenas nos países da América do Norte e Europa (WHO, 2012). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem que a introdução da PCV7 causou uma pressão seletiva que promoveu um aumento de IPD causadas por sorotipos não presentes na vacina. Por exemplo, foi verificado aumento de 2 vezes na incidência do sorotipo 19A na Ásia e Europa, sendo que atualmente este sorotipo é o mais comum causador de IPD em crianças de países em desenvolvimento (Mehr, Wood, 2012). Sugere-se também que cepas de sorotipos da vacina possam ter adquirido nova cápsula através da troca de material genético, gerando mutantes expressando cápsulas não presentes na vacina, além disso, essa troca pode ter alterado genes da proteína de ligação à penicilina, aumentando então a incidência de cepas

resistentes (Croucher et al., 2014). Por estas razões, a PCV7 está sendo gradualmente substituída pelas PCV10, da GSK, e PCV13, da Pfizer, vacinas produzidas com cápsulas polissacarídicas de 10 e 13 sorotipos diferentes respectivamente, que estão disponíveis no mercado desde 2009 e que apresentariam cobertura superior a 70% (faixa de: 70%–84% e 74%–88%, respectivamente) para todas as regiões do mundo (WHO, 2012).

No Brasil, foi estimada cobertura de 72% para a PCV13, que foi significativamente superior aos 59,3% para a PCV10 e 58,4% para a PCV7 (Franco et al., 2010). Não obstante, em 2010, a PCV10 foi introduzida no Programa Nacional de Imunização do Brasil, a um custo de R\$ 31 a dose, intervenção que foi considerada custo-efetiva, apesar de o custo-efetivo ideal ser de aproximadamente R\$ 20 (Sartori et al., 2012). Resultados promissores foram relatados após um ano da administração da PCV10 no Brasil, pois houve redução de hospitalizações de crianças por pneumonia em 3 das 5 cidades estudadas (Afonso et al., 2013). No entanto, outro estudo no sul do Brasil, que avaliou os sorotipos isolados de pacientes hospitalizados com IPD em um período posterior à introdução da PCV10, sugeriu que a cobertura da PCV10 seria de apenas 48,7% para os sorotipos causadores de IPD na região (Mott et al., 2014).

Apesar dos problemas de cobertura limitada e do aumento de isolados multidroga resistentes, a Organização Mundial da Saúde recomenda a inclusão da PCV nos programas nacionais de imunização de crianças, pois acredita que o uso das PCV de cobertura mais abrangente atenuará o problema da substituição dos sorotipos. Porém, ela também recomenda o monitoramento epidemiológico de rotina dos sorotipos causadores de IPD pelos centros de vigilância locais (Organización Panamericana de la Salud – OPS, 2011; WHO, 2012).

Outra desvantagem das PCV é seu alto custo de produção, que inclui cultivo de pneumococos dos diferentes sorotipos, purificação dos polissacarídeos, conjugação com proteínas, e purificação dos conjugados, fazendo com que essas vacinas se tornem inviáveis para aplicação nas regiões mais pobres e de maior incidência da doença. Portanto, devido aos fatores de: limitada cobertura frente ao grande número de sorotipos existentes; anticorpos induzidos pela vacina não exibirem resposta cruzada entre os sorotipos; e seu alto custo de produção, faz-se necessária a utilização de novas abordagens para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, de amplo espectro e mais acessível.

2.3.1 Uma velha abordagem para os novos problemas

Muitas vacinas foram descobertas, desde 1798, quando se iniciou o estudo da vacinologia a partir das observações de Edward Jenner, que constatou que se um indivíduo

contraísse o vírus da varíola bovina, ele estaria imune à doença causada pelo vírus da varíola humana. Nestes primeiros momentos, nada se sabia sobre vacinologia ou imunologia, portanto as descobertas de Jenner foram o ponto de partida de uma ciência que veio se desenvolver muitos anos depois. Naquela época, os estudos eram totalmente empíricos, não se conheciam os mecanismos envolvidos ou necessários para o desenvolvimento de uma vacina de grande eficácia, mas aqueles estudos baseavam-se em observações e experimentações que muito ensinaram para a evolução da ciência e da vacinologia. Muito depois, em meados da década de 1950, John Enders e colaboradores desenvolveram técnicas essenciais para o crescimento de vírus em cultura de células *in vitro*, o que deu início ao que ficou conhecido como a era dourada das vacinas. Utilizando a estratégia de Louis Pasteur, muitos grupos verificaram que executando-se diversas passagens de vírus em cultura de células era possível produzir cepas atenuadas que perdiam a virulência, mas que mantinham a imunogenicidade. Com base nessas tecnologias descobertas no passado, desenvolveram-se as vacinas de 1ª geração, que são compostas de microrganismos vivos atenuados ou inativados e que permitiram o controle de diversas doenças. Como exemplos de vacinas inativadas tem-se as vacinas contra febre tifóide, cólera, coqueluche, influenza, poliomielite administrada via intramuscular. E de vacinas atenuadas tem-se as vacinas contra raiva, febre amarela, poliomielite administrada via oral, sarampo, varíola, sendo que esta última foi erradicada graças ao uso da vacina de 1ª geração (Plotkin, 2005, 2011).

Atualmente, com o desenvolvimento da biologia molecular, novas ferramentas como a genômica, a proteômica, a vacinologia reversa, dentre outras, estão sendo utilizadas para auxiliar no entendimento de diferentes patógenos, assim como para elucidar os seus mecanismos de infecção e os mecanismos da resposta imune do hospedeiro contra estes patógenos. Em teoria, estes conhecimentos poderiam promover o desenvolvimento de vacinas que substituíssem algumas vacinas atuais menos eficazes, ou contra patógenos para os quais ainda não existem vacinas comerciais disponíveis, pois seriam produtos direcionados ao tipo de resposta imune desejada para o controle da infecção. De fato, estes conhecimentos promoveram a diminuição do tempo de descobrimento de uma possível nova vacina, porém muitos desses produtos não conseguem percorrer o longo caminho do desenvolvimento, pois nos primeiros ensaios em humanos mostram-se ineficazes, ou até mesmo não seguros, como o caso da vacina para HIV. Isto ocorre devido ao fato de os animais utilizados nos estudos de candidatos vacinais apenas mimetizarem o sistema imunológico de humanos, porém não serem o real hospedeiro do patógeno contra o qual se deseja montar uma resposta imune efetora (Rappuoli, Aderem, 2011).

Utilizando-se dessas modernas ferramentas, muitas pesquisas têm sido realizadas para obtenção de novas vacinas mais eficazes e de ampla cobertura contra o pneumococo. Estas possíveis vacinas são baseadas em proteínas pneumocócicas que se mostraram altamente imunogênicas e protetoras em modelo animal, sendo que algumas já foram utilizadas em ensaios em humanos como revisado por Darrieux et al. (2013), porém nenhuma delas foi além da fase II, fase do ensaio clínico em que se avalia a eficácia das vacinas (ClinicalTrials.gov, 2014b), indicando a dificuldade de se obter uma vacina independente de sorotipo, mesmo utilizando as novas tecnologias. Como exemplo, a proteína A de superfície de pneumococo (PspA), que está presente em todas as cepas deste patógeno, apesar de apresentar alguma variabilidade, demonstrou ser altamente imunogênica em ensaio clínico de fase I. Os anticorpos produzidos em humanos foram utilizados em ensaios de imunização passiva de camundongos, ou seja, foi feita a transferência desses anticorpos para camundongos não imunizados, e estes animais foram protegidos em ensaios de desafio letal utilizando 6 cepas virulentas (Briles et al., 2000). Porém, existe preocupação quanto à possibilidade de geração de autoimunidade em humanos, devido à reação cruzada de anticorpos anti-PspA contra a proteína miosina (informação verbal)¹, e os ensaios clínicos não prosseguiram.

Com base no sucesso das vacinas de 1ª geração, uma possível alternativa para os problemas apresentados pelas vacinas polissacarídicas seria a utilização do pneumococo inteiro inativado, pois isso induziria resposta imune contra todos os antígenos dessa bactéria, e uma vez que estes antígenos estão presentes em todos os sorotipos, geraria uma proteção independente de sorotipo. De fato, esta abordagem não é nova, pois há relatos de testes em humanos com diferentes cepas de pneumococo inativadas em meados de 1910. Uma meta-análise de dados antigos da literatura sugere que ocorreu a prevenção de infecções pneumocócicas utilizando essa abordagem vacinal (Chien et al., 2010). Esta antiga estratégia foi adaptada utilizando as técnicas atuais de biologia molecular, para proporcionar uma cepa mais segura para uso em humanos. A princípio foi proposto um modelo de imunização intranasal, pois a vacina celular inativada poderia induzir resposta imune de mucosa e sistêmica e seria de fácil administração, com uma cepa sem cápsula polissacarídica e geneticamente modificada para remoção do gene da autolisina LytA, para proporcionar obtenção de maior densidade celular em cultivos, e por fim inativada com etanol. Esta vacina celular pneumocócica, constituída de células inteiras e por isso designada WCV, do inglês

¹ Workshop Report: Perspectives in Protein Vaccines against Pneumococcus. Instituto Butantan, Novembro, 2010. Professor mediador: Dr. David E. Briles - University of Alabama at Birmingham.

whole cell vaccine, protegeu camundongos em ensaios de colonização com uma cepa sorotipo 6B, que é normalmente associada à IPD em crianças e resistência a antibióticos, e protegeu ratos após desafio intratorácico com uma cepa sorotipo 3 (Malley et al., 2001). Portanto, uma cepa sem cápsula e inativada protegeu animais em ensaios de desafio com 2 cepas encapsuladas de sorotipos diferentes, evidenciando uma resposta imune independente do sorotipo da cápsula.

Em trabalhos seguintes, o mesmo grupo estudou o mecanismo de atuação da WCV. Foi verificado que a proteção mediada por esta vacina não dependia da resposta imune baseada em anticorpos, pois camundongos geneticamente modificados para o bloqueio do desenvolvimento de células B, produtoras de anticorpos, foram protegidos pela WCV em ensaios de desafio. Além disso, constatou-se que o mecanismo de proteção também não dependia de linfócitos T CD8⁺, mas sim de linfócitos T CD4⁺, células que deveriam estar então presentes no momento do desafio dos animais, para que a redução da colonização pudesse ser observada (Malley et al., 2005). Em outro trabalho, foi identificada a produção de IL-17A em cultura de esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com WCV e estimulados *in vitro* com o mesmo antígeno, as células produtoras de IL-17A foram identificadas como linfócitos T CD4⁺ por análise de citometria de fluxo e os níveis dessa citocina se correlacionaram com a redução da colonização. Neste mesmo trabalho, o grupo constatou que camundongos deficientes para produção de IFN- γ ou IL-4, quando imunizados com WCV foram protegidos em ensaios de colonização com a bactéria encapsulada, tal como observado para camundongos normais, portanto o mecanismo de ação da vacina foi independente de citocinas do perfil Th1 ou Th2. Como somente camundongos deficientes para o receptor de IL-17A não foram protegidos, estes resultados comprovaram o envolvimento de uma resposta antígeno-específica, não dependente de anticorpos e mediada por células Th17, que são linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17A (Lu et al., 2008).

Para o desenvolvimento de novas vacinas, é importante o conhecimento e a padronização de ensaios em laboratório que comprovem sua eficácia. Portanto, são necessários ensaios imunológicos que se correlacionem com a proteção, caso o indivíduo fosse infectado. Além disso, este tipo de ensaio pode ser utilizado para o controle lote a lote da produção (Thakur et al., 2012). O desenvolvimento de novas vacinas pneumocócicas conjugadas requer a análise por ELISA de anticorpos anticápsula, sendo que níveis acima de 0,35 $\mu\text{g/mL}$ foram estabelecidos como quantidade suficiente para proteção contra IPD em crianças. No entanto, idosos normalmente apresentam níveis superiores aos requeridos e mesmo assim estão suscetíveis às infecções pneumocócicas, sugerindo a não funcionalidade

dos anticorpos. Por isso, outras metodologias como o ensaio de opsonofagocitose (OPA) têm sido estudadas como ensaios de referência para medir a capacidade protetora dos anticorpos (Burton, Nahm, 2006). A maioria das novas vacinas pneumocócicas em desenvolvimento baseia-se em proteínas, então a dosagem de anticorpos contra os antígenos estudados, assim como observado para as vacinas polissacarídicas, não é adequada para utilização como correlato de proteção, pois indivíduos que já tiveram contato com pneumococo podem apresentar anticorpos contra proteínas desta bactéria adquiridos de maneira natural (Malley et al., 2007). Além disso, a simples dosagem de anticorpos contra proteínas pneumocócicas não pode ser utilizada para fins de comparação com as vacinas existentes, pois cada vacina geralmente utiliza mecanismos diferentes de atuação. Portanto, o desenvolvimento de outras metodologias se faz necessário para averiguar a capacidade de proteção de novos tipos de vacina pneumocócica, e talvez utilizá-las como ferramenta de comparação com as vacinas já licenciadas. Ensaio de estimulação da produção de IL-17A e ensaios de desafio em animal são metodologias que têm sido utilizadas para desvendar o mecanismo de proteção da WCV, além disso, poderiam ser empregadas tanto no controle de qualidade da vacina lote a lote, além de acompanhar a resposta imune em humanos nos ensaios clínicos e eventualmente servir como correlatos de proteção.

2.3.2 *Desenvolvimento da vacina pneumocócica celular*

Diversas modificações foram realizadas no processo de obtenção e na formulação da WCV para torná-la factível e adaptá-la às normas atuais de produtos farmacêuticos para uso em humanos.

Primeiramente, estudos foram realizados a respeito do meio de cultura ideal para crescimento do pneumococo para utilização na indústria farmacêutica e que atendessem aos requisitos dos órgãos regulatórios para produtos humanos, que recomendam não utilizar compostos derivados de animais provenientes de países onde existe ou possa existir a doença encefalopatia espongiforme bovina (Advisory Committee, 2000; FDA letter, 2000). Foi desenvolvido então um novo meio de cultura a base de hidrolisado enzimático de soja, designado como EHS, que atende às especificações para uso humano e apresentou rendimento 2,5 vezes maior do que o meio de cultura a base de hidrolisado ácido de caseína (Liberman et al., 2008). O meio de cultura EHS foi desenvolvido tomando como ponto de partida o meio de cultura de Hoeprich (1955), que contém hidrolisado ácido de caseína, peptona sem os

aminoácidos asparagina e glutamina, por isso ambos foram adicionados ao meio de cultura EHS. No momento em que o meio de cultura EHS foi desenvolvido, o metabolismo de aminoácidos do *S. pneumoniae* não estava completamente elucidado, portanto ainda não se sabia que a asparagina não era necessária para o crescimento do pneumococo (Härtel et al., 2012). Entretanto, como vários estudos já haviam sido conduzidos com o meio de cultura EHS com esta formulação, a asparagina foi mantida.

Outra modificação foi a substituição do adjuvante, pois na formulação inicial foi utilizada a toxina colérica (CT) em todos os ensaios imunológicos, porém sua utilização em humanos não é permitida, devido ao seu conhecido efeito tóxico (Bharati, Ganguly, 2011). Também foram avaliadas outras vias de imunização, pois o público alvo dessa vacina, as crianças, poderia com frequência apresentar muco nasal espesso, o que inviabilizaria a administração por via nasal. Além disso, de acordo com a via de imunização escolhida pode-se ou não utilizar um determinado adjuvante, portanto, a via de administração da WCV passou a ser subcutânea, utilizando o adjuvante hidróxido de alumínio, formulação que protegeu camundongos em ensaios de desafio de colonização e de invasão após aspiração do pneumococo (Lu et al., 2010a,b). Essa via de imunização foi escolhida por ser recomendada pela WHO (2008), além disso, o hidróxido de alumínio é utilizado na maioria das vacinas comerciais, sendo um dos poucos adjuvantes licenciados para uso em humanos (Mbow, et al., 2010).

Outros inativantes bacterianos também foram estudados, a fim de encontrar uma opção ao uso do etanol, para posteriormente facilitar o gerenciamento dos resíduos de uma eventual planta de produção desta vacina (Lu et al., 2010a). Além disso, foi observado que o uso de outros inativantes aumentou em 100 vezes a proteção de camundongos em ensaios de colonização quando comparada à vacina inativada com etanol, provavelmente devido às diversas etapas de lavagem para remoção do etanol que também removeram proteínas solúveis e talvez outros componentes que foram liberados quando a vacina foi inativada (Lu et al., 2010a). O inativante BPL, que reage principalmente com a guanina causando alterações no material nucleico, foi então selecionado, pois ele tem sido utilizado por alguns fabricantes na inativação de vírus para a produção de vacinas contra raiva e influenza (WAVE, 2008), substituindo o formaldeído. A inativação completa do microrganismo é dependente da quantidade de DNA presente, da concentração do BPL, tempo e temperatura de exposição (Perrin, Morgeaux, 1995). A vantagem do uso desse agente inativante é que ele pode ser completamente hidrolisado quando exposto a 37 °C e seu produto de degradação não é tóxico (Perrin, Morgeaux, 1995). Assim, diferentemente do etanol, não é necessário realizar uma

etapa para remoção do BPL, o que simplifica ainda mais o processo de produção da vacina, além disso, antígenos importantes não são removidos nas etapas de lavagem.

Investiu-se também no melhoramento da cepa para diminuir os riscos de possíveis efeitos colaterais, devido à presença da toxina Ply. Esta proteína tem propriedades citotóxicas devido à sua ligação ao colesterol da membrana plasmática formando oligômeros e gerando poros que ocasionam hemólise (Marriott et al., 2008). Por isso, a cepa foi modificada para a produção da toxina inativada geneticamente para geração do toxoide PdT (Lu et al., 2010a). Este toxoide é um derivado do gene *ply* com três mutações: Trp-433-Phe, Cys-428-Gly e Asp-385-Asn. As substituições de triptofano e cisteína reduziram a atividade hemolítica e com isso o PdT manteve apenas 0,0001% da atividade da toxina nativa. Já a substituição de aspartato reduziu a habilidade de ativar o sistema complemento (Berry et al., 1995). Apesar destas alterações, as propriedades imunogênica (Basset et al., 2007) e agonista de TLR4 (Malley et al., 2003) da proteína foram mantidas.

Após definida a nova estratégia para a produção da WCV, lotes foram produzidos em condições de boas práticas de fabricação (BPF) e a vacina foi utilizada em ensaios pré-clínicos e toxicológicos em coelhos, com dosagens de 50, 500 e 5000 µg de proteína total, e não se observaram alterações macroscópicas como perda de apetite, temperatura corpórea ou dermatite local. Algumas alterações típicas do processo inflamatório decorrente da vacinação foram verificadas, como por exemplo, aumento de neutrófilos e monócitos, inflamação subcutânea ou muscular local (Lu et al., 2010b). A WCV também foi utilizada em ensaio clínico fase I em humanos, que corresponde ao ensaio de segurança do produto em adultos saudáveis para detecção de algum possível efeito colateral, concluído em abril/2013. Cada grupo recebeu doses de 100, 300 ou 600 µg de proteína total adsorvida ao hidróxido de alumínio, além do grupo placebo. Os efeitos colaterais apresentados pelos grupos vacinados não foram significativamente diferentes do grupo controle que recebeu placebo (ClinicalTrials.gov, 2014a).

2.4 Estratégias de cultivo em biorreator

O processo de produção da WCV foi desenvolvido e padronizado no Instituto Butantan de maneira a atender as normas de BPF vigentes. Foram realizados cultivos descontínuos em biorreator de 60 L, com coleta das células no final da fase exponencial de crescimento, ou seja, com DO aproximadamente 6,0, e posterior inativação com BPL (Gonçalves et al., 2014).

Há várias maneiras de se conduzir um cultivo, sendo as três principais: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo.

2.4.1 Processo descontínuo

O processo descontínuo, também conhecido como batelada ou *batch*, caracteriza-se pela introdução do inóculo no instante inicial do cultivo no interior de um biorreator contendo meio de cultura esterilizado, para que ocorra o crescimento do microrganismo. Ao longo do processo nada é adicionado, exceto gases como oxigênio, para processos aeróbios, antiespumante e ácido ou base para o controle do pH, considera-se portanto, que o volume dentro do biorreator seja constante (Carvalho, Sato, 2001a). No processo batelada, normalmente, é possível observar as 4 principais fases de crescimento: lag, logarítmica ou exponencial, estacionária e declínio. Na fase lag, os microrganismos se adaptam ao novo ambiente, que ocorre após a introdução do inóculo, em geral é uma fase de baixa taxa de divisão celular. Na fase de crescimento, o microrganismo se divide com velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$). Na fase estacionária, a taxa de crescimento é praticamente zero, em geral devido à depleção de nutrientes. E por fim, a fase de declínio, em que a taxa de crescimento é inferior a taxa de morte, devido ausência de nutrientes ou a presença de subprodutos tóxicos para o microrganismo (Rani, Rao, 1999; Hiss, 2001).

Este tipo de processo é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia, por apresentar vantagens como: menores riscos de contaminação, por se tratar de sistema fechado, sendo este o mais seguro para manutenção as condições de assepsia; pode ser realizado em fases sucessivas no mesmo reator; maior controle sobre a estabilidade genética do microrganismo; dentre outras. Porém, o cultivo descontínuo apresenta desvantagens como: baixos rendimentos e produtividades; a adição do substrato de uma só vez no início do processo pode exercer efeitos de inibição, repressão ou desvio do metabolismo para subprodutos indesejáveis; maiores “tempos mortos”, ou seja, tempos com a lavagem, esterilização, enchimento e esvaziamento do biorreator (Carvalho, Sato, 2001a). Apesar das desvantagens, o processo descontínuo é de extremo interesse, pois fornece informações básicas da cinética de crescimento do microrganismo, sendo necessárias para a realização de processos alternativos que terão como base para comparações o processo descontínuo (Schmidell, Facciotti, 2001).

De maneira geral, os cultivos de *Streptococcus pneumoniae* apresentados na literatura foram realizados utilizando a metodologia do processo descontínuo para a produção de

polissacarídeo capsular e obtenção das vacinas comerciais. Baixas DO são obtidas, portanto baixa biomassa, provavelmente devido aos genes de autolisinas como *lytA*. Em cultivo estático, portanto sem controle de pH, a cepa não capsulada R6 atingiu DO igual 1,0 em 4 horas de cultivo (Charpentier et al., 2000), em contrapartida uma cepa similar, mas com deleção para *lytA*, atingiu DO igual a 2,5, também em cultivo estático com meio de cultura semelhante (Liberman et al., 2008). Em cultivo descontínuo realizado em biorreator e com controle de pH, foram obtidos < 2 g/L de massa seca da cepa capsulada sorotipo 23F (Gonçalves et al., 2002), enquanto que para a cepa não encapsulada e também com a deleção para *lytA* foram obtidos 3,5 g/L de massa seca (Liberman et al., 2008). Estas baixas quantidades de biomassa em processos descontínuos também foram obtidas para várias cepas encapsuladas diferentes, como exemplo a cepa 5284 sorotipo 14 com biomassa máxima igual a 1,61 g/L (Gogola-Kolling et al., 2014), a cepa 113/95 também sorotipo 14 com biomassa máxima de 1,13 g/L (Leal et al., 2011) e a cepa St 99/95 sorotipo 23F com máximo de 1,26 g/L (Gonçalves et al., 2002).

Normalmente, o principal objetivo dos processos biotecnológicos é maximizar a produtividade, ou seja, a mais alta quantidade do produto de interesse em um dado volume em certo tempo de cultivo. Para isso altas densidades celulares são requeridas (Riesenberg, Guthke, 1999). Neste trabalho, foram requeridos cultivos de alta densidade celular para obtenção de maior massa celular, sendo este o produto de interesse. Para obtenção de cultivos em alta densidade celular é necessário que os nutrientes sejam adicionados durante a fermentação na proporção do consumo pelo microrganismo (Kleman, Strohhohl, 1994), por isso cultivos descontínuos alimentados e contínuos com reciclo de células foram realizados, pois são considerados como modos de operação ideais para aumentar a densidade celular. Além disso, devido às desvantagens apresentadas pelo processo descontínuo, é importante a avaliação de outras estratégias de fermentação para possibilitar maior crescimento celular e, portanto maior rendimento de doses de vacina por processo fermentativo.

2.4.2 Processo descontínuo alimentado

O processo descontínuo alimentado, também conhecido como batelada alimentada, ou *fed-batch*, pode ser conduzido de várias maneiras. Em uma das mais comuns, inicia-se com o crescimento das células em regime de batelada e antes do fim da fase exponencial de crescimento inicia-se a entrada de solução contendo nutrientes. Esta solução deve ter a concentração de nutrientes necessária para manter o crescimento do microrganismo e

simultaneamente reduzir a produção de subprodutos indesejados do metabolismo, pois estes podem conduzir à morte celular mesmo em condições em que os nutrientes ainda estejam disponíveis ou sendo fornecidos (Ienczak et al., 2013).

Quando comparado os processos descontínuos, é observado aumento na produtividade e na obtenção do produto final nos cultivos descontínuos alimentados em estudos com diferentes bactérias. Por exemplo, no cultivo descontínuo alimentado de *Escherichia coli* foi obtido aumento de 3 vezes na quantidade de massa seca em relação ao processo descontínuo (Luli, Strohl, 1990). Para bactérias pertencentes ao grupo LAB, em que a maior produção de lactato é almejada, cultivos descontínuos alimentados de *Lactobacillus casei* apresentaram aumento de 59,7% na produtividade volumétrica de lactato e 68,6% de aumento na massa seca obtida em comparação com os descontínuos (Ding, Tan, 2006).

Apesar da vantagem do processo descontínuo alimentado de adicionar os nutrientes de acordo com a demanda do microrganismo, o que poderia prevenir possível inibição do crescimento causada pelo substrato, além do controle da velocidade do fornecimento do substrato limitante, o que permitiria manter a velocidade de crescimento celular em níveis desejáveis e assim minimizar a formação de metabólitos tóxicos (Carvalho, Sato, 2001b), que para o pneumococo seriam o lactato e o acetato, não há a possibilidade de controlar a velocidade de crescimento deste microrganismo para baixa produção de ácidos, mesmo controlando o substrato fornecido. Isto porque esta bactéria produz as enzimas LctO e SpxB ativas mesmo em altas concentrações de glicose, como mencionado na seção 2.1.1, indicando que seus genes não são regulados por sistema de repressão catabólica (Taniai et al., 2008). Além disso, mutações sítio dirigidas do gene *ldh* não tiveram sucesso (Chapuy-Regaud et al., 2001), portanto não foi possível a mutação desta bactéria para redução da produção de metabólitos inibitórios através do desvio da sua rota metabólica para a produção somente de acetato, que seria mais rentável em termos de ATP. Finalmente, o metabolismo energético do pneumococo leva necessariamente à produção de ácidos, sendo estes os produtos finais da via glicolítica (seção 2.1.1). Além disso, apesar do processo descontínuo alimentado ser o modo de operação mais popular para aumentar a biomassa e a produtividade, ele apresenta desvantagens como: as variáveis do processo são de difícil controle; é difícil definir a qualidade do produto apesar de muito importante; os parâmetros são muito variáveis ao longo do tempo de cultivo; e principalmente a dificuldade na otimização da taxa de alimentação (Rani, Rao, 1999).

Como estratégias de manipulação genética do pneumococo para minimizar a produção de ácidos foram inviáveis, a solução para aumentar a produção de células seria uma estratégia

de fermentação que removesse a elevada quantidade de ácidos produzidos por este microrganismo. Por isso, a outra estratégia avaliada neste trabalho foi o processo contínuo com reciclo de células.

2.4.3 *Processo contínuo*

O processo contínuo caracteriza-se pela alimentação contínua de meio de cultura a determinada vazão constante, permitindo que não ocorra falta de nutrientes para o microrganismo, e o volume do reator deve ser mantido constante através da retirada contínua do caldo fermentado. A manutenção deste volume é essencial para que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, ou do inglês *steady state*, quando a concentração de células, de substrato e de produto permanecem constantes ao longo do processo (Facciotti, 2001). Todo processo contínuo inicia-se com a batelada, e em fase exponencial de crescimento do microrganismo inicia-se a entrada de meio esterilizado proveniente de um reservatório que é balanceado com a saída do meio utilizado, permanecendo no reator células vivas e debris, essa fase é conhecida como regime transiente, na qual ainda não se atingiu o estado estacionário. Quando o sistema entra em equilíbrio, o crescimento de novas células é balanceado com as que são removidas. Portanto, o crescimento de biomassa será igual à taxa em que a cultura está sendo diluída, denominada D (Hoskisson, Hobbs, 2005).

Diversos estudos de fisiologia e metabolismo de microrganismos foram conduzidos utilizando o processo contínuo, devido à possibilidade de manter constantes as condições de crescimento, no entanto, com o advento da biologia molecular, houve declínio na utilização desse tipo de processo. Recentemente, na era pós genômica, novamente ressurgiu sua utilidade para o estudo de limitação nutricional e resposta a estresse, devido à ausência de efeitos secundários que podem mascarar mudanças fisiológicas sutis, pois esse processo confere vantagens como controle do ambiente do microrganismo e reprodutibilidade (Hoskisson, Hobbs, 2005). Outras vantagens do processo contínuo são: aumento da produtividade do processo em virtude da redução de “tempos mortos” ou não produtivos; obtenção do caldo fermentado uniforme que pode facilitar as operações de purificação do produto de interesse; e a possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção (Facciotti, 2001).

O processo contínuo tem sido aplicado na prática na produção de etanol em escala industrial e no tratamento biológico de resíduos, como exemplo, efluentes de indústrias

alimentícias, de laticínio e de bebidas. Além disso, há estudos de sua utilização para obtenção de outros produtos como lactato e acetato (Chang et al., 2014; Facciotti, 2001). Quando avaliada a produção de lactato, diversos trabalhos comparam os processos descontínuo e contínuo, observou-se que é possível obter maiores concentrações de lactato e maiores rendimentos com o processo descontínuo, principalmente devido à utilização total do substrato fornecido, no entanto o processo contínuo resulta em maiores produtividades, devido à possibilidade de utilizar altas taxas de diluição (Hofvendahl, Hahn-Hägerdal, 2000). Como exemplo, o cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3534 em batelada produziu 83 g/L de lactato, enquanto que em processo contínuo produziu 55 g/L, mas a produtividade foi superior no processo contínuo, 5,3 g/L.h, 3,5 vezes maior que a do processo descontínuo (Hofvendahl, Hahn-Hägerdal, 2000). Outro exemplo de mais alta produtividade no processo contínuo foi o cultivo de *Lactobacillus rhamnosus*, em que se obteve o valor de 15,74 g/L.h, que foi 5 vezes maior que a do processo descontínuo (Ling et al., 2006). Para a cepa 5284 de pneumococo sorotipo 14, diferentes produtividades volumétricas para lactato foram obtidas de acordo com a taxa de diluição, sendo a mais alta obtida 11,93 g/L.h em processo contínuo, com $D = 0,8 \text{ h}^{-1}$ que foi diferente do processo descontínuo que obteve 2,45 g/L.h (Gogola, 2011).

Apesar das vantagens do cultivo contínuo, o uso desta técnica na pesquisa e na indústria ainda é limitado, por causa da dificuldade de se manter a cultura por longos períodos sem mutação genética, a qual poderia gerar mutantes menos produtivos, ou contaminação microbiológica por se tratar de sistema aberto que requer maiores cuidados com as condições assépticas (Toda, 2003). Outras desvantagens desse processo são: maior investimento na planta de produção; dificuldade de manutenção de homogeneidade no reator quando se trabalha com baixas vazões; dificuldades de operação no estado estacionário como formação de espuma, crescimento do microrganismo nas paredes do reator ou nos sistemas de entrada e saída (Facciotti, 2001).

Existem várias formas de operação do processo contínuo, como: cultivo em único estágio, ou seja, um único reator, que pode ser com ou sem reciclo de células; cultivo em múltiplos estágios, que pode ser com uma ou múltiplas alimentações. O processo contínuo com reciclo de células tem como objetivo a obtenção de alta densidade celular no reator, aumentando assim consideravelmente as velocidades e, portanto a produtividade (Facciotti, 2001). O reciclo interno é realizado pela retenção das células no interior do reator, através da sedimentação ou por filtração no interior do reator. Já o reciclo externo é realizado pela circulação do efluente do biorreator por separadores celulares como filtros, membranas, centrífugas, sedimentadores, e com isso um fluxo rico em células retorna ao reator, enquanto

que o permeado ou filtrado é removido livre de células (Ienczak et al., 2013). Muitas vantagens e desvantagens foram observadas para cada metodologia, por isso a avaliação de cada uma delas é necessária antes de sua aplicação. Por exemplo, a técnica de sedimentação tem aplicações na produção de etanol, é de baixo custo e fácil de escalonar, mas necessita de cepas capazes de flocular e a taxa de diluição utilizada é limitada para manter baixa vazão e permitir a sedimentação. A filtração interna não necessita de recirculação do permeado, é simples de operar, porém a vazão pode diminuir devido entupimento do filtro. A centrifugação tem aplicação industrial e suporta grandes volumes, no entanto é mais difícil de manter as condições assépticas e tem alto custo de implantação. A membrana de separação externa apresenta alta razão da área filtrante por volume de trabalho, leva à obtenção de altas densidades de biomassa e pode ter módulos substituídos durante a operação, mas esta metodologia pode limitar o fornecimento de oxigênio para as células que o necessitam durante a recirculação, podem ocorrer danos nas células, e sugere-se dificuldade na esterilização e na manutenção da homogeneidade do reator (Chang et al., 1994).

Outra vantagem do processo contínuo com reciclo é a possibilidade de operar o sistema acima da velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo, podendo ir além do limite imposto ao processo contínuo sem reciclo, em que a taxa de diluição não pode exceder o $\mu_{\text{máx}}$. (Ienczak et al., 2013). Portanto, se a taxa de crescimento celular é dependente da taxa de diluição, isto determina maior conversão de substrato em produto e maior produtividade. Na prática, a capacidade de filtração é o que limita a taxa de diluição. Filtração com membranas é a mais amplamente utilizada em cultivos com reciclo de células, sua principal vantagem é a aplicação da maior área de filtração por volume de biorreator, sendo a fibra-oca a que fornece a maior razão, porém não é resistente a altas pressões transmembranas (Chang et al., 1994).

A inibição pelo produto é o principal fator limitante no processo de fermentação convencional para produção de lactato, e para que ocorra o aumento da produtividade é preciso que o mesmo seja removido, além do aumento da biomassa (Ohleyer et al., 1985). As mais altas produtividades volumétricas para lactato foram obtidas pela recirculação de células no processo contínuo, que variaram entre 52 a 144 g/L.h, de acordo com a LAB e o substrato utilizado. Além disso, mais altas densidades celulares de LAB foram obtidas com esse tipo de processo, entre 48 a 103 g/L (Hofvendahl, Hahn–Hägerdal, 2000). Bactérias do gênero *Streptococcus* foram utilizadas em cultivo contínuo com reciclo de células e também foram obtidas altas densidades celulares. Com o cultivo contínuo de *Streptococcus cremoris* utilizando sistema de filtração de cerâmica externo foram obtidas 81,5 g/L de massa seca, enquanto que o

processo descontínuo apresentou apenas 2,28 g/L, que representou em aumento na produtividade de células de 19 vezes (Taniguchi et al., 1987). No cultivo contínuo de *Streptococcus lactis* utilizando sistema de fibras-ocas para microfiltração tangencial, menor aumento foi obtido, 18,9 g/L de massa seca, enquanto que em processo descontínuo foram obtidos 1,7 g/L (Holst et al., 1985).

A principal vantagem do processo contínuo com reciclo para atender o objetivo deste trabalho é a possibilidade da remoção dos metabólitos inibidores do crescimento a níveis aceitáveis para favorecer o crescimento do microrganismo, assim como a reposição do substrato limitante, mantendo as células produzidas no interior do reator. Outra vantagem do processo contínuo com reciclo de células para este trabalho é integrar o sistema de filtração externa utilizada no reciclo com o sistema aplicado na separação celular e posterior coleta do produto final, reduzindo os “tempos mortos” de operação na planta de produção e minimizando os riscos de contaminação durante a troca dos sistemas de reciclo e de concentração do produto. Em suma, o processo contínuo com reciclo de células pode ser uma estratégia favorável para o aumento da biomassa, objetivo principal deste trabalho, através da remoção dos metabólitos que viabilizaria o maior crescimento celular, além da vantagem de diminuir os riscos de contaminações deste sistema aberto de fermentação com a utilização da mesma fibra-oca nas etapas de reciclo e separação celular e lavagem das células.

2.4.4 Equacionamento do processo contínuo com reciclo de células

Esquemáticamente, o sistema contínuo com reciclo externo de células pode ser representado como disposto na Figura 5.

Figura 5 – Esquema do processo contínuo com reciclo de células

Fonte: Modificado de Facciotti (2001).

Sendo que F (L/h) é a vazão de alimentação; S_0 (g/L) a concentração do substrato limitante no meio de alimentação; F_s (L/h) a vazão de saída do líquido efluente; X (g/L) a concentração de biomassa; S (g/L) concentração do substrato limitante; c é a fração do líquido efluente removida diretamente do reator sem passar pelo filtro, ou conhecido como “purga”; h é o fator de diluição da concentração celular obtido no filtrado; g é o fator relativo ao incremento da concentração celular obtido no separador, sendo $g > 1$; a é a fração da vazão do líquido efluente que é reciclada.

A vazão do líquido efluente é a soma das vazões de saída do sistema e de retorno ao reator, tem-se:

$$F_s = (1-c)F + cF + aF_s \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Portanto:} \quad F_s = F / (1-a) \quad (\text{Eq. 2})$$

Segundo Facciotti (2001), efetua-se o balanço material para células do processo contínuo com reciclo externo de células, com a seguinte equação:

$$V \frac{dX}{dt} = V\mu X + aF_s \cdot gX - F_s X \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo que V (L) é o volume de meio de cultura no reator; t (h) tempo de cultivo; μ (h^{-1}) velocidade específica de crescimento.

Considerando D a vazão específica de alimentação ou taxa de diluição (h^{-1}), representada pela equação 4:

$$D = F / V \quad (\text{Eq. 4})$$

Ainda de acordo com Facciotti (2001), se dividirmos a equação 3 pelo volume, substituímos F_s pela equação 2, e empregarmos a equação 4, além de alguns rearranjos, tem-se:

$$\frac{dX}{dt} = \left\{ \mu - \left[D \cdot \left(\frac{1-ag}{1-a} \right) \right] \right\} \cdot X \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{Seja:} \quad B = \frac{(1-ag)}{(1-a)} \quad (\text{Eq. 6})$$

Com base na equação 5, utilizando a equação 6, tem-se então a equação 7:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - BD) \cdot X \quad (\text{Eq. 7})$$

E para o regime permanente do cultivo contínuo com reciclo externo de células, tem-se então:

$$\mu = BD \quad (\text{Eq. 8})$$

B é denominada a razão de “purga”, do inglês *bleeding*, ou seja, é a saída direta de líquido efluente do reator sem passar pela membrana. Sendo $B < 1$, significa que o produto de $ag < 1$, pois $ag = 1$ indicaria uma situação em que todas as células seriam recicladas e com isso, na equação 6, B seria igual a 0, e nesta condição não é possível atingir o estado estacionário ou regime permanente. Portanto, para um sistema contínuo com reciclo de células em regime permanente, a “purga” é imprescindível para manutenção do estado estacionário.

Neste trabalho, o fator h (Figura 5) foi equivalente a zero, pois foi adotado um filtro absoluto (0,22 μm) para separação do caldo fermentado, ou seja, não houve perda de células no filtrado. Além disso, não foi realizado “purga”, portanto todas as células retornaram ao biorreator após serem concentradas no filtro. Isto porque as células são o produto de interesse, portanto o cultivo contínuo com reciclo de células foi conduzido até obtenção da maior biomassa possível.

Portanto, com base na equação 7, se B for igual à zero, ou seja, sem a realização de “purga”, indica uma situação na qual todas as células são recicladas ao reator, não sendo possível atingir o estado estacionário. Neste caso, ao invés da equação 7, teremos a mesma equação 9 que descreve o crescimento celular em cultivos descontínuos. Quando isso acontece, o cultivo é limitado pelo entupimento do filtro.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{Eq. 9})$$

2.5 O uso da citometria de fluxo em bioprocessos

A habilidade de controlar um processo fermentativo de maneira automática e precisa para operação em sua condição ótima é considerada de muito interesse na indústria de bioprocessos. Controles apropriados permitem a redução dos custos de produção e aumento de rendimento, enquanto que ao mesmo tempo mantem a qualidade desejada do produto (Rani, Rao, 1999). Muitas pesquisas estão sendo realizadas para o desenvolvimento de sensores para obter melhor detalhamento e monitoramento de bioprocessos. O acompanhamento e a análise dos componentes biológicos, físicos e químicos de um bioprocessos são de grande interesse e podem ser realizados de duas maneiras: através da retirada de amostra seguida de análise em etapas separadas do volume total do biorreator ou pela integração do sistema analítico para o monitoramento direto, ou seja, em tempo real. A concentração de biomassa, que pode estar relacionada à quantidade de células viáveis ou ao total de células presentes no reator, é uma das mais importantes variáveis analisadas em bioprocessos (Scheper, Lammers, 1994). Muitas metodologias foram desenvolvidas para análise em tempo real ou não, cada uma com suas vantagens e desvantagens. O principal exemplo é a técnica gravimétrica, cujas células são separadas por centrifugação ou filtração. Centrifugação é o método mais barato, porém apresenta desvantagens como: grandes volumes são requeridos e maiores erros são esperados quando avaliadas concentrações celulares de menor densidade; necessidade de pesagem dos tubos antes do procedimento, além da remoção da água adsorvida no recipiente; a demora na inativação das células pode levar ao aumento da biomassa posterior à coleta; a biomassa pode ser perdida nas etapas de lavagem. Já o método de filtração é mais caro, pois os filtros não podem ser reutilizados, mas é possível trabalhar com menores volumes. O entupimento dos filtros se o caldo for viscoso ou se a densidade celular estiver muito elevada é uma importante limitação desse método. Outra técnica utilizada é a contagem de células, que pode ser realizada por plaqueamento em meios semissólidos para contagem de colônias, ou através da observação em microscópio. Em geral, essa técnica requer etapas prévias de diluição e desagregação no caso de células que formam grumos. É trabalhosa e nem sempre todas as células vivas presente na amostra formarão colônias em placas, além da análise estatística desta técnica ser questionável devido aos desvios normalmente elevados (Sonnleitner et al., 1992). Um excelente método alternativo para análise detalhada da população de células que fornece informações sobre características celulares, como viabilidade, forma e componentes celulares é a citometria de fluxo, que pode analisar de maneira rápida individualmente as células de uma população (Scheper, Lammers, 1994).

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular de parâmetros intrínsecos e extrínsecos baseados na dispersão de luz e sinais de fluorescência e que fornece informações sobre a cultura ao nível de unidades celulares. Primeiramente, a suspensão de células é inserida no citômetro de fluxo e o fluído deste equipamento confina as células em uma corrente única para dispô-las individualmente para a incidência de um feixe de laser, como apresentado na Figura 6. A dispersão de luz ou fluorescência, neste caso na utilização de fluorocromos, é captada pelos detectores e finalmente correlacionada com parâmetros celulares estruturais e funcionais. Sinais de dispersão de luz estão relacionados aos parâmetros intrínsecos das células já que são obtidos sem que as células sejam marcadas com fluorocromo. A fração da dispersão de luz coletada na mesma direção da incidência, de 0 a 10°, é conhecida como FSC, do inglês *Forward Scatter*, sendo que esta se refere ao tamanho celular, enquanto que a dispersão de luz coletada lateralmente pelas lentes posicionadas a 90° do eixo de incidência do laser refere-se ao SSC, do inglês *Side Scatter*, que é proporcional a complexidade da célula. Os outros detectores também posicionados a 90°, FL1, FL2 e FL3, que captam a emissão de fluorescência da célula previamente marcada com algum fluorocromo. Existe grande variedade de fluorocromos, assim como várias aplicações em citometria de fluxo. Alguns fluorocromos ligam-se a componentes celulares específicos como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, proporcionando aumento da fluorescência. Alguns acumulam-se em determinados compartimentos celulares, enquanto que outros captam reações enzimáticas celulares específicas, ou são ativados em determinadas condições como alteração de pH, polarização da membrana celular, etc. Além disso, existe a aplicação de anticorpos específicos marcados com fluorocromos, para detectar por exemplo a produção imediata da proteína de interesse. Uma importante característica da técnica de citometria de fluxo é a possibilidade de analisar grande número de partículas em curto espaço de tempo, de 5.000 a 100.000 células por segundo, de acordo com o equipamento, além da possibilidade de análise de múltiplos parâmetros simultaneamente. Esta tecnologia vem sendo aplicada em diferentes áreas como na indústria farmacêutica, de laticínios, de bebidas, tratamento de água, análises ambientais, etc. (Díaz et al., 2010).

Figura 6 – Esquema de um citômetro de fluxo.

(1) presença do fluido para formação de uma corrente única de células; (2) incidência do feixe de luz laser nas células individualmente, emitindo diferentes sinais relacionados à diversos parâmetros celulares; (3) dispersão da luz e emissão de fluorescência de cada partícula são detectadas pelo sistema óptico composto por filtros e espelhos; (4) sinais são coletados pelo sistema de detecção FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 e por fim os sinais são enviados ao computador para representação da distribuição da população em relação aos diferentes parâmetros avaliados. Fonte: Modificado de Díaz et al.(2010).

O uso de fluorocromos para marcação de células obtidas em bioprocessos para análise por citometria de fluxo pode ser exemplificada por Hewitt et al. (2000), que realizaram cultivos descontínuos alimentados de *Escherichia coli* em alta densidade celular e evidenciaram mudança progressiva na fisiologia das células ao longo do cultivo devido a alterações no ambiente, no caso diferentes concentrações de glicose e oxigênio dissolvido. Estas modificações foram observadas com o uso de um fluorocromo que internaliza células com membrana citoplasmática despolarizada e outro que marca células com membrana permeabilizada. Além disso, os autores compararam cultivos em pequena e grande escala, 5 e 20.000 L respectivamente, e mostraram que no maior reator, que não foi homogeneizado apropriadamente, obtiveram menor concentração de biomassa mas com maior quantidade de células viáveis, enquanto que no reator de pequena escala, maior concentração de biomassa, porém menor quantidade de células viáveis, evidenciando que a técnica de citometria de fluxo

pode ser uma importante ferramenta no estudo do escalonamento de cultivos, e esta alteração na escala pode resultar em células com diferentes condições fisiológicas, além de sugerir que a análise apenas da biomassa não reflita a obtenção do produto de interesse, já que apenas células viáveis são capazes de produzi-lo (Hewitt et al., 2000).

Portanto, a técnica de citometria de fluxo apresenta características que suportam sua utilização para análise de bioprocessos e que podem contornar os problemas apresentados pelas técnicas convencionais de análise de biomassa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem

A cepa RM200 de *Streptococcus pneumoniae* foi utilizada nas fermentações deste trabalho. Ela foi gentilmente cedida pelo Dr. Richard Malley do Boston Children's Hospital. Esta cepa foi obtida a partir do derivado não capsulado do sorotipo 2, conhecido como Rx1. A cepa foi inicialmente modificada para remoção do gene da toxina pneumolisina e inserção do gene codificador do toxoide PdT. Esta cepa, então designada Rx1E, foi modificada para remoção do gene da autolisina, através da inserção de um cassete que confere resistência ao antibiótico canamicina, resultando no genótipo Rx1E PdT Δ lytA (Lu et al., 2010a).

3.2 Meios de cultura e soluções

3.2.1 Meios de cultura utilizados nos cultivos

O meio de cultura que foi utilizado para o crescimento da cepa de *S. pneumoniae* RM200 tanto para a produção do banco de células quanto para os processos fermentativos foi o meio livre de produtos de origem animal, EHS, previamente desenvolvido para proporcionar um bom crescimento para este microrganismo (Lieberman et al., 2008). Este meio foi preparado com os seguintes componentes principais: hidrolisado enzimático de soja (ou soytone) e extrato de levedura como fontes de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, além de outros componentes descritos nas Tabela 1 e 2. Soytone e extrato de levedura também possuem carboidratos em sua composição, sendo 292,5 mg/g de soytone e 163,3 mg/g de extrato de levedura, segundo especificações do fabricante (Becton, Dickinson and Company, 2006). O pH do meio de cultura foi corrigido entre 7,5 a 7,6 com hidróxido de sódio (Merck). O meio de cultura foi esterilizado por filtração, utilizando filtro hidrofílico de membrana PVDF Durapore® de 0,22 μ m (Millipore, Billerica, MA, EUA) no momento em que o volume foi transferido para o interior da dorna.

Tabela 1 – Composição do meio de cultura inicial EHS

Componentes	Concentração			Unidade
	Processo descontínuo (EHS 2%)	Processo descontínuo alimentado (EHS 0,5%)	Processo contínuo - fase batelada (EHS 0,5%)	
Soytone ^a	20,0	5,0	5,0	g/L
Extrato de levedura ^a	20,0	20,0	20,0	g/L
Glicose ^b	20,0	20,0	20,0	g/L
Fosfato de potássio anidro (K ₂ HPO ₄) ^b	3,82	3,82	3,82	g/L
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) ^b	1,00	1,00	1,00	g/L
Glutamina anidra ^b	0,625	0,625	0,625	g/L
Colina ^c	0,01	0,01	0,01	g/L
Asparagina monoidratada ^b	0,113	0,113	0,113	g/L
Solução de sais	2,0	2,0	2,0	mL/L
Ácido tioglicólico 10% ^d	1,0	1,0	1,0	mL/L

Marcas dos componentes utilizados. a- Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, EUA; b- Merck, Darmstadt, Alemanha; c- Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA; d- Carlo Erba, Rodano, MI, Itália.

Tabela 2 – Composição da solução de sais

Componentes	Concentração	Unidade
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	250	g/L
Sulfato de ferro (FeSO ₄ .7H ₂ O)	2,5	g/L
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,4	g/L
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .H ₂ O)	0,18	g/L
Ácido clorídrico	10	mL/L

Todos os componentes utilizados foram da marca Merck.

A composição dos meios de cultura utilizados na alimentação dos processos descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células foi a mesma descrita nas Tabela 1 e 2, exceto para a concentração de soytone, extrato de levedura e glicose, que foram alterados conforme especificado na Tabela 3. Os meios de culturas foram filtrados em 0,22 µm e foram

mantidos em frascos de vidros esterilizados e despirogenizados até o momento da alimentação do biorreator.

Tabela 3 – Alteração da concentração de componentes para os meios de cultura utilizados na alimentação

Processo	Componentes			Unidade
	Glicose ^c	Extrato de levedura ^b	Soytone ^b	
Descontínuo Alimentado	100	80	20	g/L
Contínuo com reciclo (condição 1 e 2) ^a	20	20	5	g/L
Contínuo com reciclo (condição 3 e 4) ^a – fase 1	20	20	5	g/L
Contínuo com reciclo (condição 3) – fase 2	40	40	10	g/L
Contínuo com reciclo (condição 4) – fase 2	30	30	7,5	g/L

a- Meio de cultura para alimentação não foi alterado em relação ao meio utilizado na fase batelada. Marcas dos componentes utilizados: b- BD; c- Merck.

3.2.2 Outros meios de culturas e soluções diversas

O tampão utilizado nas etapas de lavagem das células, e que compõe o produto final, foi o Ringer-lactato modificado pelo acréscimo de 0,2% (m/v) glicose, que foi utilizada como estabilizante para as células, com composição descrita na Tabela 4. O tampão não teve seu pH corrigido e em todos os processos ele ficou na faixa de 6,1 a 6,6. Este tampão foi esterilizado por filtração em 0,22 µm no momento do uso, diretamente para dentro do biorreator.

Tabela 4 – Composição do tampão Ringer-lactato

Componentes	Concentração	Unidade
Cloreto de Sódio	5	g/L
Cloreto de Potássio	0,3	g/L
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,2	g/L
Lactato de Sódio	3	g/L
Glicose	2	g/L

Todos os componentes utilizados foram da marca Merck.

As placas de meio de cultura utilizadas nos ensaios de pureza, viabilidade e controle da inativação, durante e após o cultivo, e no ensaio de opsonofagocitose para contagem das

unidades formadoras de colônias (UFC) foram produzidas com BHI-ágar sangue. Alguns lotes foram produzidos pela Seção de Meios de Cultura do Instituto Butantan e outros lotes foram produzidos no próprio laboratório utilizando os componentes descritos na Tabela 5. Foram utilizados também alguns lotes comerciais de TSA-ágar sangue (bioMérieux, Jacarepaguá, RJ, Brasil).

Tabela 5 – Composição do meio BHI-ágar sangue

Componentes	Concentração	Unidade
Ágar	15	g/L
Infusão de cérebro e coração (BHI)	37	g/L
Sangue de carneiro ou cavalo	50	mL/L

Ágar e BHI, ambos da marca BD, foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 25 min. O sangue, obtido da Seção de Meios de Cultura do Instituto Butantan, foi acrescentado sob condições de assepsia quando a temperatura do meio atingiu 50 °C.

A solução salina tamponada com fosfato (PBS), utilizada para lavagem das células no preparo da massa seca, foi preparada no laboratório, conforme a Tabela 6, e esterilizada por filtração em 0,22 µm. Nos ensaios imunológicos, foi utilizado PBS comercial (Cellgro, Manassas, VA, EUA), previamente esterilizado por filtração 0,22 µm, quando necessário.

Tabela 6 – Composição do PBS

Componentes	Concentração	Unidade
Cloreto de Sódio	8	g/L
Cloreto de Potássio	0,2	g/L
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	1,44	g/L
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	0,24	g/L

Todos os componentes utilizados foram da marca Merck.

As demais soluções utilizadas e sua forma de preparo estão descritas abaixo:

- NaOH 5M: hidróxido de sódio (Merck) diluído para 5M e esterilizado em autoclave;
- PPG: solução de polipropileno glicol (Fluent Cane 114, Brenntag Química Brasil, Guarulhos, SP, Brasil) diluído para 30% (v/v) e esterilizado em autoclave;

- meio de cultura THY utilizado para o cultivo das cepas de isolados clínicos: meio Todd-Hewitt (BD) suplementado com 0,5% (m/v) de extrato de levedura (BD), esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min;
- hidróxido de alumínio (Alum): produto comercial Alhydrogel 2% - $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Brenntag North America, Reading, PA, EUA) diluído para 1 mg/mL em solução salina comercial, NaCl 0,85% (B. Braun Medical Inc., Bethlehem, PA, EUA);
- meio de cultura para células sanguíneas: DMEM com L-glutamina (Cellgro) contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino com baixo nível de endotoxina (HyClone, Logan, UT, EUA), 50 μM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e 10 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico ciprofloxacina (Cellgro), esterilizado por filtração em 0,22 μm ;
- solução PBS-T: solução PBS adicionada de 0,05% (v/v) Tween (Sigma-Aldrich);
- solução PBS-BSA para bloqueio do ELISA: 1% (m/v) de albumina bovina (Sigma-Aldrich) diluída em PBS e esterilizada por filtração 0,22 μm ;
- streptavidina-HRP: solução de streptavidina conjugada à peroxidase do kit de dosagem de IL-17A, diluída 1:200 em PBS-BSA;
- substrato da enzima peroxidase para realização de ELISA: solução comercial Sureblue TMB (KPL Inc., Gaithersburg, MD, EUA);
- tampão LDS: tampão de amostra 4X do kit NuPAGE (Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) adicionado do agente redutor 10X, preparado conforme instruções do fabricante;
- tampão MES: tampão de corrida comercial MES-SDS running buffer 20X (Boston BioProducts Inc., Ashland, MA, EUA) diluído em água destilada para 1X;
- tampão de transferência: Nupage transfer buffer 20X (Invitrogen) diluído para 1X com 20% (v/v) metanol;
- PBST-milk: solução PBS-T contendo 5% (m/v) leite desnatado (BD);
- tampão opsono: solução HBSS (Cellgro ou Invitrogen) contendo 0,1% (m/v) de gelatina (Sigma-Aldrich);
- solução de fixação de células para análise no citômetro de fluxo: solução 1% (m/v) de paraformaldeído (Sigma-Aldrich).

3.3 Preparo do banco de células

Foi produzido um lote semente e em seguida um lote trabalho da cepa RM200. Em ambos os lotes, a cepa foi cultivada em meio EHS 2%, preparado conforme Tabela 1, em cultivo estático a 36 °C ($\pm 0,5$), até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO) de aproximadamente 2,0. Em seguida, o material cultivado foi centrifugado a 5000 rpm (2988 g), à 18 °C, por 10 min, para posterior descarte do sobrenadante. As células foram ressuspensas com meio EHS fresco contendo 40% (v/v) de glicerol (Merck) previamente esterilizado em autoclave. Em seguida, a suspensão celular foi aliquoteada em criotubos de 1,5 mL e congelada a -80 °C.

3.4 Cultivos em biorreator

A bactéria *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 foi cultivada em biorreator Bioflo 410 (New Brunswick Scientific Company Inc., Edison, NJ, EUA; atual Eppendorf Inc., Enfield, CT, EUA), de capacidade de 14 L e volume de trabalho de 10,5 L, localizado no Laboratório Especial Piloto de Produtos Biológicos Recombinantés do Instituto Butantan. Foram realizados os processos: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células, com monitoramento em tempo real e controladores automáticos de temperatura (36 °C), pH (7,0), agitação (150 rpm) e vazão de nitrogênio (0,1 vvm). O pH foi mantido pela adição automática de NaOH 5M. A solução de PPG foi adicionada manualmente durante o cultivo como antiespumante, quando necessário.

Para todos os cultivos, o inóculo foi preparado da mesma maneira: cerca de 750 µL do estoque congelado foi adicionado em um frasco contendo 500 mL do mesmo meio de cultura utilizado em cada fermentação, e incubado em cultivo estático a 36 °C, por cerca de 5 h, até obter uma DO de aproximadamente 2,0, que se refere ao final da fase exponencial quando realizado cultivo estático. Então, todo o volume foi transferido para a dorna, para obtenção de DO inicial de aproximadamente 0,1. O reator já continha 10 L de meio de cultura, previamente esterilizado por filtração em 0,22 µm e saturado com N₂, para realização dos processos descontínuo e contínuo com reciclo, sendo portanto um volume inicial de trabalho de 10,5 L. Para o processo descontínuo alimentado, o volume de meio de cultura foi 8 L, portanto neste caso o volume inicial de cultivo foi 8,5 L.

3.4.1 *Processo descontínuo*

Para o processo descontínuo foram realizados quatro cultivos para avaliar a cinética de crescimento, depois foram realizados mais dois cultivos para a coleta do produto final. Em um deles, as células foram coletadas no final da fase exponencial. No outro, as células foram coletadas na DO máxima de crescimento obtida para esta cepa neste tipo de processo, ou seja, no início da fase estacionária.

3.4.2 *Processo descontínuo alimentado*

Para o processo descontínuo alimentado foram realizados cinco cultivos para avaliar a cinética de crescimento, além de dois cultivos para a coleta do produto final, um na fase exponencial, e o outro na DO máxima de crescimento para este processo. Depois de 3 h de cultivo, quando a DO atingiu aproximadamente 4,0, iniciou-se a alimentação com o meio de cultura concentrado quatro vezes para os componentes soytone e extrato de levedura e cinco vezes para glicose, conforme previamente descrito na Tabela 3, com uma vazão de 0,5 L/h, com o auxílio de uma bomba peristáltica dosadora (ChemTecTM Smart Metering Pump, Scilog Inc., Madison, WI, EUA).

3.4.3 *Processo contínuo com reciclo de células*

Os cultivos referentes a este tipo de processo foram realizados utilizando 4 condições distintas, cada uma visando a aumentar a produção de biomassa em relação ao processo precedente. Para todos os cultivos, foi realizada uma fase inicial de batelada até aproximadamente DO 4,0, cerca de 3 h de cultivo. Depois foi realizada uma etapa de concentração das células com retirada do caldo fermentado e reposição do volume com meio fresco (condições 1 a 3, Tabela 7), e então se iniciou o processo de reciclo mantendo constante o volume de meio no reator. Alternativamente, iniciou-se o reciclo diretamente após o fim da fase inicial de batelada, sem a etapa de remoção do caldo e reposição do volume com meio fresco (condição 4, Tabela 7). A saída do caldo fermentado foi realizada pelo fundo do reator, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Easy-load tubing pump, Millipore), que direcionou o caldo para o sistema de microfiltração tangencial de fibras-ocas de membranas de polissulfona de 0,1 μm de porosidade e 0,92 m^2 de área (CFP-1-E-35A, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Este sistema foi previamente sanitizado com

NaOH 0,5M e lavado com água estéril. Adicionalmente, uma bomba peristáltica foi utilizada para controle da vazão do permeado e outra para controle da vazão de entrada do meio de cultura fresco na dorna (modelos 504U e 323U, respectivamente, Watson-Marlow Inc., Wilmington, MA, EUA). A pressão de entrada da fibra-oca foi inicialmente ajustada para 4 a 5 psi e foi sempre mantida abaixo de 10 psi ao longo do reciclo, pois esta é a máxima pressão de trabalho para esta fibra-oca, segundo especificações do manual (GE, 2004). Concomitante à saída do caldo, iniciou-se o retorno da suspensão concentrada proveniente do sistema de fibras-ocas e a adição do meio de cultura fresco, por uma entrada no tampo da dorna. Na etapa de reciclo, o volume foi mantido constante em 10 L dentro da dorna. A massa dos frascos contendo o meio de cultura de alimentação e o permeado livre de células foram medidas com balanças Combics2 (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha) a cada 30 minutos ou menos para o controle das vazões de entrada e saída. O meio de cultura utilizado para a alimentação foi previamente borbulhado com N_2 para diminuir a concentração de oxigênio, visto que esta bactéria não cresce bem em cultivos *in vitro* em aerobiose (Carvalho et al., 2013). O esquema do processo contínuo com reciclo de células está representado na Figura 7.

Figura 7 – Esquema do processo contínuo com reciclo de células

Para o planejamento das estratégias a serem adotadas nos processos contínuos, foram feitas simulações utilizando o software AnaBio (Silva et al., 2003). Para isso, foram utilizados

diversos parâmetros cinéticos obtidos nos procedimentos precedentes à próxima estratégia de fermentação a ser adotada.

3.4.3.1 Diferentes condições de cultivo para o processo contínuo

Todos os cultivos contínuos foram realizados até atingir a DO máxima em cada condição. A condição de cultivo nº 1 foi realizada da seguinte maneira: após a fase de batelada de aproximadamente 3 h de cultivo, o volume do reator foi reduzido para 4 L através microfiltração tangencial com retorno das células concentradas para a dorna, sendo que este procedimento foi realizado com a máxima velocidade permitida pela restrição da fibra-oca. Depois, o meio de cultura fresco foi introduzido até 10 L no reator, para então começar o processo de reciclo com vazão de 3 L/h até o esgotamento do meio de cultura para alimentação, momento em que se iniciou o procedimento de coleta das células. A condição nº 2 de cultivo foi realizada da mesma maneira que a condição nº 1, porém após aproximadamente 5 h de cultivo, a vazão de reciclo foi aumentada para 6 L/h e o processo foi interrompido quando não houve mais aumento da DO.

O cultivo referente à condição nº 3 foi realizado em duas fases de reciclo. Primeiramente foi realizada a fase de batelada de aproximadamente 3 h, da mesma maneira que nos cultivos das condições nº 1 e 2, em seguida iniciou-se a concentração das células para 4 L, depois a adição de 6 L de meio de cultura fresco, para então dar-se início à primeira fase do reciclo com vazão de 3 L/h. A segunda fase iniciou-se após aproximadamente 5 h de cultivo, quando uma nova etapa de concentração das células foi realizada, neste caso com a remoção de 4,5 L, seguida da reposição até 10 L no reator com meio de cultura fresco duas vezes concentrado para glicose, extrato de levedura e soytone, conforme previamente especificado na Tabela 3. Em seguida, iniciou-se o reciclo com este mesmo meio duas vezes concentrado com vazão de 6 L/h.

Para os cultivos referentes à condição nº 4, não foi feita a concentração das células e reposição do volume com meio fresco. Neste caso, após aproximadamente 3 h de cultivo, iniciou-se o reciclo com vazão média de 7,3 L/h. Após aproximadamente 5,5 h de cultivo, iniciou-se o reciclo com a alimentação de meio de cultura 1,5 vezes concentrado para glicose, extrato de levedura e soytone. Para fins de comparação, a Tabela 7 resume as quatro condições realizadas para o processo contínuo com reciclo de células, que foram descritas acima.

Uma vez que a taxa de diluição (D) é dada por:

$$D = \frac{F}{V_{\text{cult}}} \quad (\text{Eq. 10})$$

sendo F a vazão de reciclo e V_{cult} o volume teórico de todo o sistema, que compreende o volume de trabalho do biorreator acrescido do volume presente nas mangueiras e fibras-ocas (V_{fibra}), pode-se calcular os diferentes D utilizados por cultivo (Tabela 7).

Tabela 7 – Resumo das condições utilizadas para o processo contínuo com reciclo de células

	Condição 1 (n=1)	Condição 2 (n=1)	Condição 3 (n=1)	Condição 4 (n=3)
Nº etapas de concentração e reposição com meio de cultura fresco	1	1	2	0
Início da concentração (h)	3,2	3,1	3,1 e 5,3	NA
Volume de meio retirado na etapa de concentração (L)	6,5	~ 7	5,5 (fase 1) 4,5 (fase 2)	NA
Início do reciclo (h)	3,6	3,5 e 5,1	3,5 (fase 1) 5,7 (fase 2)	média 3,4
Vazão do reciclo (L/h)	3	3 e 6	3 (fase 1) 6 (fase 2)	7,3
D (h^{-1})	0,26	0,26 e 0,52	0,26 (fase 1) 0,52 (fase 2)	0,63
Meio de cultura utilizado na reposição e no reciclo ^a	1 X	1 X	1 X (fase 1) 2 X (fase 2)	1 X e 1,5 X

NA = Não aplicável; a- Concentração de soytone, glicose e extrato de levedura.

3.5 Análises das amostras dos processos fermentativos

Foram coletadas amostras a cada 30 minutos, ou 15 minutos durante a fase exponencial, pelo amostrador 1 da Figura 7, para realização das seguintes análises:

a) Concentração celular

- medida da DO a 600 nm com espectrofotômetro U-1800 UV-Vis (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão);
- para análise de massa seca foram separados 45 mL de cultura para amostras de baixa densidade celular (até DO 2,5) ou 30 mL de cultura para amostras com DO acima de 2,5, em tubos previamente secos em estufa a 60 °C por 2 dias e pesados

em balança analítica. Para inativação das bactérias, formaldeído 38% (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi adicionado imediatamente às amostras para uma concentração final de 2% (v/v). Nos processos contínuos, constatou-se através da coloração de Gram que as células das amostras de alta densidade celular não estavam fixadas apropriadamente, por isso nas amostras com DO acima de 12 passou-se a utilizar concentração final de 5% (v/v) de formaldeído. Após incubação de > 18 h à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (5810R, Eppendorf) a 4000 rpm (3200 g) por 20 min, depois os *pellets* foram lavados com PBS, centrifugados novamente, e então foram secos em estufa a 60 °C por 2 dias. A diferença entre a massa dos tubos cheios e vazios foi usada para a determinação da massa seca contida em 45 ou 30 mL de cultura, que foi depois convertida para g/L;

- algumas amostras foram plaqueadas em placas BHI-ágar sangue, após diluição seriada em tampão Ringer-lactato. As placas foram incubadas a 37 °C em jarra de anaerobiose, por 24 a 42 h para posterior contagem de UFC para análise da viabilidade;

- b) Consumo de glicose e produção de metabólitos: foram centrifugados 2 mL de cada amostra, ou 4 mL no caso de amostras recolhidas até 2h de cultivo, a 14.000 rpm (17.530 g) por 5 min (Mikro 120, Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Alemanha) para separação celular. Além disso, foram coletadas amostras de microfiltrado dos processos contínuos pelo amostrador 2 da Figura 7. Todos sobrenadantes aliquoteados foram mantidos a -80 °C até o momento da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, modelo SCL-10AVP, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Para esta análise foi utilizada a coluna Aminex HPX-87H de 300 x 7,8 mm (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA), a 60 °C e com solução 5 mM de ácido sulfúrico (H₂SO₄) como fase móvel à vazão de 0,6 mL/min. A glicose foi detectada pelo índice de refração e os ácidos orgânicos pela absorbância à 210 nm. Os cromatogramas foram analisados pelo software Class VP versão 6.14 SP2 (Shimadzu);
- c) Pureza: algumas das amostras coletada foram analisadas por microscopia óptica (Eclipse E-200, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) quanto à morfologia bacteriana pela coloração de Gram, utilizando o kit Newprov (Pinhais, PR, Brasil). Além disso, as placas utilizadas para a contagem de UFC foram utilizadas para análise da morfologia das colônias;

- d) Tamanho e complexidade: os *pellets* de células, obtidos após a centrifugação para análise dos sobrenadantes, foram lavados com PBS, ressuspensos em solução de fixação de células e armazenados a 4 °C até o dia da leitura no citômetro de fluxo FACSCanto (BD) para análise do tamanho (FSC) e complexidade (SSC) empregando o software FlowJo;
- e) Integridade da fibra-oca: algumas amostras do microfiltrado (amostrador 2) foram plaqueadas em placas BHI-ágar sangue para a confirmação da ausência bacteriana.

3.6 Cálculos dos parâmetros cinéticos

As metodologias empregadas para o cálculo dos parâmetros cinéticos de todos os cultivos estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Cálculo dos parâmetros cinéticos

(continua)

Parâmetro	Símbolo	Descrição
Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})	$\mu_{\text{máx.}}$	Coefficiente angular da regressão linear de $\ln(\text{DO})$ em função do tempo durante a fase exponencial de crescimento
Volume de meio de cultura do sistema (L)	V_{sist}	$V_0 + V_{\text{alim}} + V_{\text{fibra}} - V_{\text{retirado}}$ (Eq. 11)
Biomassa total produzida (g)	X_{total}	biomassa final no reator + biomassa retirada nas amostragens – biomassa do inóculo
Glicose total consumida (g)	S_{total}	Glicose fornecida (inicial + alimentada) – glicose residual no reator – glicose retirada no microfiltrado e amostragens
Lactato total produzido (g)	$\text{lac}_{\text{total}}$	Lactato presente no reator ao término do cultivo + lactato retirado no microfiltrado e amostragens – lactato inserido no inóculo
Acetato total produzido (g)	$\text{acet}_{\text{total}}$	Acetato presente no reator ao término do cultivo + acetato retirado no microfiltrado e amostragens – acetato inserido no inóculo
Fator de conversão de glicose à biomassa ($\text{g}_{\text{massa seca}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)	$Y_{X/S}$	Coefficiente angular da regressão linear da curva de formação de biomassa (g) em função do consumo de glicose (g)
Fator de conversão de glicose à acetato ($\text{g}_{\text{acetato}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)	$Y_{\text{acet}/S}$	$\frac{\text{acet}_{\text{total}}}{S_{\text{total}}}$ (Eq. 12)

(conclusão)

Parâmetro	Símbolo	Descrição
Fator de conversão de glicose à lactato (g lactato/g glicose)	$Y_{lac/S}$	Coefficiente angular da regressão linear da curva de produção de lactato (g) em função do consumo de glicose (g)
Produção de lactato por grama de célula (g lactato/g massa seca)	$Y_{lac/X}$	Coefficiente angular da regressão linear da curva de produção de lactato (g) em função da formação de biomassa (g)

O fator de conversão do substrato glicose em produto lactato ($Y_{lac/S}$) foi determinado pelo coeficiente angular da reta de regressão dos pontos da curva de produção de lactato em função do consumo de glicose, com um coeficiente de correlação (R) igual a 0,99 para todos os cultivos, com auxílio do software Origin. No entanto, o fator de conversão global de glicose em acetato ($Y_{acet/S}$) foi calculado pela equação 12 da Tabela 8, pois o R obtido para o coeficiente angular da reta foi sempre menor que 0,98. Os outros fatores, $Y_{X/S}$ e $Y_{lac/X}$ também apresentaram R igual a 0,99, mas foram determinados apenas para os cultivos em que a massa seca foi mensurada.

Também foram calculadas as produtividades volumétricas de células e de lactato, e o número hipotético de doses que cada cultivo poderia gerar, para isso utilizou-se as equações descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Cálculo da produtividade de células e de lactato e do número hipotético de doses

Parâmetro	Símbolo	Processo Descontínuo	Processo Contínuo
Produtividade volumétrica de células (g massa seca/L.h)	P_X	$\frac{X_{máx.} - X_0}{t - t_0}$ (Eq.13)	$\frac{X_{máx.} - X_0}{t - t_0}$ (Eq. 13)
Produtividade volumétrica de lactato (g lactato/L.h)	P_{lac}	$\frac{lac_{máx.} - lac_0}{t - t_0}$ (Eq. 14)	$lac_{máx.} \cdot D$ (Eq. 15)
Número hipotético de doses	-	$\frac{(Conc. proteica \cdot Vol. produto final)}{0,3 \text{ (mg) proteína por dose}}$	(Eq. 16)

A equação usada para o cálculo de P_X foi a mesma para os dois processos distintos, pois o processo contínuo não foi mantido em regime permanente, ele foi interrompido no

regime transiente, no momento em que a máxima DO foi atingida, portanto utilizou-se a mesma equação do processo descontínuo. Já para P_{lac} utilizou-se a equação do regime permanente, pois trata-se de uma estimativa de qual seria a produtividade caso o cultivo fosse mantido naquelas condições para produção industrial de lactato.

3.6.1 *Análises estatísticas dos cultivos*

Para os vários cultivos realizados de um mesmo tipo de processo, foram calculadas as curvas médias e o desvio padrão dos resultados de DO, UFC/mL, concentração de massa seca, lactato, acetato e glicose residual para todas as amostras, no mesmo instante de tempo, utilizando o software Origin. Para fins de comparação entre os processos descontínuo, descontínuo alimentado e o contínuo com reciclo de células, foram calculadas as médias dos valores das variáveis citadas acima e dos parâmetros cinéticos e fatores de conversão obtidos no momento de máxima DO de cada cultivo. A diferença estatística entre as médias foi analisada utilizando ANOVA um fator, com teste Tukey para múltipla comparação, com nível de confiança $\alpha = 0,05$, com auxílio do software GraphPad Prism.

Para análise estatística da avaliação econômica dos produtos finais obtidos, foram comparados os custos estimados dos principais compostos usados para produzir a vacina e os números hipotéticos de doses obtidas nos cultivos dos seguintes grupos: processos descontínuos com bactérias cultivadas até DO = 6; descontínuos até DO máxima; e cultivos dos processos contínuos com reciclo de células condição 4, utilizando ANOVA um fator, com teste Tukey e nível de confiança $\alpha = 0,05$ empregando o software GraphPad Prism.

3.7 **Separação celular e preparo do produto final**

Após os cultivos atingirem DO 6, que foi definida para os cultivos em escala piloto, ou DO máxima, iniciou-se o processo de separação e lavagem das células, que foi feito por dois métodos: centrifugação e microfiltração tangencial.

Para a separação por centrifugação dois tubos de 33 mL cada foram coletados do biorreator, centrifugados a 4000 rpm (1930 g) por 20 min a 18 °C (centrífuga Sorvall RC5C, Du Pont Company, Newtown, CT, EUA). Depois foram adicionados 33 mL de tampão Ringer-lactato, previamente preparado conforme descrito em 3.2, e então os *pellets* foram agitados em vórtex para liberar das células do fundo do tubo e desfazer grumos. Este procedimento de lavagem foi repetido por 2 vezes. Depois da última lavagem, os *pellets* foram

ressuspendidos em um volume de tampão Ringer-lactato para que a suspensão celular ficasse com DO de aproximadamente 32.

Para a separação por microfiltração tangencial, primeiramente, a cultura (ou parte dela quando a DO foi > 25) foi concentrada para 1,5 L, utilizando o sistema de microfiltração tangencial descrito na seção 3.4.3 para realização do processo contínuo com reciclo de células, respeitando o limite de pressão de 10 psi na entrada da fibra-oca. Em seguida, as células foram lavadas 6 vezes com tampão Ringer-lactato, utilizando 1,5 L para cada lavagem. Após a última lavagem, as células foram concentradas novamente para um volume 1,5 L e então tampão Ringer-lactato foi adicionado para obter uma suspensão celular com DO de aproximadamente 32.

Após a obtenção do produto final utilizando o sistema de fibras-ocas, foi calculado o rendimento da microfiltração tangencial. Para isso fez-se o seguinte cálculo:

$$\frac{(\text{DO produto final} \cdot V_{\text{pf}})}{(\text{DO final do cultivo} \cdot V_{\text{sist}})} \cdot 100 = \% \text{ rendimento} \quad (\text{Eq. 17})$$

Sendo que a DO produto final refere-se à medida de cada lote após a concentração celular e posterior ajuste para DO aproximadamente 32, conforme estabelecido anteriormente para produção da vacina celular pneumocócica (Gonçalves et al., 2014). O valor de DO final do cultivo refere-se à DO da cultura antes do início da concentração e o V_{sist} está descrito na Tabela 8. O volume do produto final (V_{pf}) foi estimado da seguinte maneira:

$$V_{\text{pf}} = V_{\text{conc}} + V_{\text{fibra}} \quad (\text{Eq. 18})$$

para os cultivos em que todo volume foi utilizado para obtenção do produto final, sendo V_{conc} o volume de produto obtido após as etapas de concentração e lavagem;

$$V_{\text{pf}} = \frac{V_{\text{sist}} \cdot \text{DO final do cultivo}}{\text{DO produto final}} \quad (\text{Eq. 19})$$

para os cultivos em que nem todo o caldo foi processado para obtenção do produto final.

Os materiais provenientes de ambos os processos de separação e lavagem de células foram submetidos ao procedimento de inativação celular previamente padronizado pelo nosso

grupo (Gonçalves et al., 2014) e descrito a seguir. As células foram inativadas utilizando BPL (Sigma-Aldrich) na proporção 1:4000 (v/v) durante um período superior a 30 h a 4 °C sob agitação constante a 150 rpm (TE-140, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). A degradação do agente inativante BPL foi realizada por aquecimento a 37 °C por 2 h sob agitação de 180 rpm no equipamento Series 25 Incubator Shaker da New Brunswick Scientific. Em seguida, amostras dos produtos finais foram submetidas aos seguintes testes no laboratório: coloração de Gram, DO após inativação, plaqueamento em BHI-ágar sangue e incubação por 2 dias a 37 °C para verificação da inativação das células, determinação da concentração de ácidos e glicose no sobrenadante por HPLC. Os produtos finais foram conservados a 4 °C e -80 °C até a realização dos ensaios de imunológicos.

3.8 Controle de qualidade do produto final

Após inativação celular, amostras dos produtos finais foram enviadas ao Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan para avaliação do conteúdo proteico total e solúvel no sobrenadante pelos métodos de Kjeldahl (Amin, Flowers, 2004) e Lowry (Lowry et al., 1951), respectivamente. Também foram analisados: pureza por coloração de Gram, DO após inativação, pH, aspecto e concentração de endotoxina pelo método cinético turbidimétrico usando o kit Endosafe (Charles River Laboratories International Inc., Charleston, SC, EUA). Foi avaliada ainda a esterilidade bacteriana e fúngica das amostras pela técnica de inoculação direta, usando o meio Tioglicolato e o meio de Caseína-Soja, para cultivo e sub-cultivo por 14 dias a 30-35 °C e 20-25 °C, de acordo com as especificações da farmacopeia americana (USP, 2011).

A concentração de proteína total nos produtos finais coletados por centrifugação, que não tinham volume suficiente para análise pelo Serviço de Controle de Qualidade, foi determinada pelo método de Lowry por meio do kit DC protein assay (Bio-Rad), utilizando solução de NaOH 0,1M para solubilização da amostra.

3.9 Western blot

A análise do perfil de proteínas dos diferentes lotes de produtos finais foi realizada por Western blot. Para isso todos os produtos finais foram diluídos para 5µg/µL de proteína. Em seguida, 10 µL desta diluição foram adicionados a 10 µL do tampão LDS. As amostras foram aquecidas a 99 °C por 1 h e então todo o volume aplicado em géis 4-12% Bis-Tris (NuPAGE)

para separação das proteínas por eletroforese. Spectra Multicolor Broad Range (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) foi usado como padrão de peso molecular. A corrida foi realizada utilizando o tampão MES a 200 V por 30-40 min. Após a corrida, as proteínas separadas nos géis de poliacrilamida foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) com corrente de 35 V por 1 h, utilizando o tampão de transferência. As membranas foram bloqueadas com PBST-milk, a 4 °C por cerca de 18 h sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente sob agitação com anticorpos específicos, descritos na Tabela 10, diluídos em PBST-milk.

Depois da incubação com os anticorpos específicos, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min, sob agitação, com PBS-T. Então, as membranas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação, com anti-IgG de coelho produzido em asno conjugado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) diluído 1:10.000 em PBST-milk. Novamente foram feitas 3 lavagens com PBS-T e as membranas foram reveladas com o Kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate por 5 min sob agitação à temperatura ambiente e depois expostas ao filme CL-XPosure Film (ambos da Thermo Fisher Scientific). As membranas, após exposição, foram tratadas com 5 mL do Restore Western blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) por 5 min à temperatura ambiente sob agitação. Após lavagem com PBS-T, estas membranas foram novamente submetidas às etapas de Western blot utilizando anticorpos específicos contra outras proteínas.

Tabela 10 – Anticorpos utilizados em Western blot contra os seguintes antígenos de *Streptococcus pneumoniae* e as respectivas diluições de cada um deles.

Nomenclatura	Especificação	Diluição
SP0785	proteína transportadora putativa	1 : 10.000
SP2145	antígeno da família de proteínas ancoradas a superfície da parede celular	1 : 2.500
SP2070	glicose-6-fosfato isomerase exposta na superfície	1 : 5.000
SP1572	PppA – proteína A protetora de pneumococo	1 : 5.000
PdT	mutante não hemolítico da Ply	1 : 10.000
PspA	proteína A de superfície de pneumococo	1 : 5.000
WCV	cepa RM200 inteira inativada	1 : 10.000

Todos os anticorpos específicos foram produzidos em coelhos. As proteínas recombinantes de pneumococo foram produzidas em *Escherichia coli* e purificadas pela equipe do Dr. Malley, em seguida empregadas para obtenção de soros hiperimunes (Cocalico Biologicals Inc., Reamstown, PA, EUA). O soro anti-WCV foi obtido nos ensaios pré-clínicos em que coelhos foram imunizados com a WCV (MPI Research, Mattawan, MI, EUA).

3.10 Ensaio de imunização de camundongos

Os produtos finais foram avaliados no laboratório do Dr. Richard Malley no Boston Children's Hospital quanto à influência dos métodos de produção e das temperaturas de armazenamento na potência das vacinas. Na Tabela 11 constam os cultivos utilizados para obtenção dos produtos finais empregados na formulação das vacinas avaliadas nos ensaios de imunização deste trabalho.

Tabela 11 – Lista dos cultivos cujos produtos finais foram avaliadas em ensaios de imunização

Cultivo	Tipo de Fermentação	DO de coleta	Processo de Separação e Lavagem das células	Temp. de armazenamento
F2103	Descontínuo simples	6,5	microfiltração tangencial	-80 °C
F0410	Descontínuo simples	6,0	Centrifugação	-80 °C
F2802	Descontínuo simples	10	microfiltração tangencial	-80 °C
F0603	Descontínuo alimentado	14	microfiltração tangencial	-80 °C
F0603	Descontínuo alimentado	14	microfiltração tangencial	4 °C
F0911	Descontínuo alimentado	14	Centrifugação	-80 °C
F0305	Contínuo com reciclo de células	20	microfiltração tangencial	-80 °C
F2407	Contínuo com reciclo de células	30	microfiltração tangencial	-80 °C

As amostras dos produtos finais descritas na Tabela 11 foram empregadas para formulação de vacinas contendo 100 µg de proteína total do produto final adsorvida a 200 µg do adjuvante Alum cada dose. Após a formulação, o período de incubação para adsorção ao adjuvante foi de 1 h a 4 °C.

Camundongos C57Bl/6, provenientes do Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA), de 4 a 6 semanas de vida, receberam 1 ou 2 doses de 200 µL de vacina, com intervalo de duas semanas entre as doses, por via subcutânea. Como controle negativo, os animais receberam apenas Alum. Como controle positivo foi utilizada a vacina produzida em cultivo de 60 L que foi obtida pelo processo descontínuo simples (lote 007/09) com DO de coleta de aproximadamente 6, cujas células foram separadas e lavadas pelo sistema de fibras-ocas. Esta vacina foi armazenada a -80 °C desde 2009 e foi a mesma utilizada na padronização dos ensaios imunológicos (Lu et al., 2010b).

Após cerca de 12 dias da última dose, os animais receberam anestesia inalatória de 3-4% de isoflurano (Piramal Critical Care Inc., Bethlehem, PA, EUA) veiculado com oxigênio a vazão de 1-3 L/min, e então foram coletadas amostras de sangue pelo plexo retrorbital. O sangue de cada camundongo foi dispensado individualmente em tubos heparinizados (Microtainer Green Tubes Lithium Heparin, BD) e empregado para avaliação da presença de anticorpos do tipo IgG presentes no soro e da produção de IL-17A após estímulo das células sanguíneas em ensaios *in vitro*. Uma semana após a coleta do sangue, os animais foram desafiados. Todos os ensaios em animais foram realizados de acordo com as normas do NIH e aprovados pelo IACUC do Boston Children's Hospital e da Harvard Medical School.

3.11 Estimulação *in vitro* das células sanguíneas

Após a coleta do sangue dos animais imunizados, uma alíquota de cada amostra foi utilizada para estimulação das células sanguíneas e posterior avaliação da produção de IL-17A. Primeiramente, foram aliquotados 25µL do sangue heparinizado de cada animal em microplaca de 96 poços com fundo U para cultura de células (Nunc, Thermo Fisher Scientific), que continham 225 µL/poço do meio de cultura para células adicionado do antígeno celular denominado WCA, que consiste do produto final do lote 007/09 antes da adsorção ao hidróxido de alumínio. WCA foi diluído 1:1000 para estimular as células sanguíneas. As amostras foram incubadas a 37 °C por 6 dias em estufa com 5% CO₂ (Thermo Fisher Scientific). Após este período, o sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado para quantificação de IL-17A por ELISA.

3.12 ELISA para anticorpos IgG

Após a separação das alíquotas de sangue utilizadas no ensaio de estimulação *in vitro* das células sanguíneas, os tubos foram centrifugados (5415D, Eppendorf) a 8.000 rpm (6000 g) por 5 min e o soro coletado foi congelado a -20 °C. Para análise de anticorpos do tipo IgG produzidos pelos camundongos, microplacas de 96 poços Nunc Maxisorp de fundo chato (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas por 18 h a 4 °C com 10,7 µg/poço de proteína do WCA lote 007/09 diluída em PBS. Depois de 3 lavagens com PBS-T, as placas foram bloqueadas com PBS-BSA por uma hora a temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem, as placas foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente com o soro obtido dos

animais imunizados diluído em PBS-T de 1:150 até 1:4050. As placas foram novamente lavadas e incubadas com 100 µL/poço do anticorpo de detecção (anti porção Fc de IgG de camundongo produzido em cabra conjugado à peroxidase, A2554; Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 em PBS-T, por uma hora à temperatura ambiente. Depois de uma nova etapa de lavagem, as placas foram incubadas com 100 µL/poço da solução de substrato por no máximo 15 min. A reação foi interrompida com 100 µL/poço de HCl 1N e depois as placas foram lidas em espectrofotômetro a 450 nm (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EUA). As medidas de absorbância foram convertidas para unidades arbitrárias de IgG, com auxílio do software SoftMax Pro (Molecular Devices), pela interpolação dos valores obtidos na curva padrão do soro de referência gerado pelo Dr. Richard Malley.

Similarmente, também foi realizado ELISA para anticorpos do tipo IgG anti-PspA presentes no soro de animais imunizados com uma ou duas doses de vacina, para isso as microplacas foram sensibilizadas com a proteína PspA recombinante e o ELISA foi realizado como descrito acima.

3.13 ELISA para IL-17A

Para análise da produção da IL-17A pelos linfócitos do sangue periférico dos animais imunizados após estímulo *in vitro*, 100 µL/poço do anticorpo de captura para IL-17A do kit Due Set ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), diluído em PBS para 2 µg/mL, foi adsorvido em microplacas de 96 poços Nunc Maxisorp de fundo chato (Thermo Fisher Scientific), durante 18 h à temperatura ambiente. Então, segundo o protocolo do fabricante, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS-BSA por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas, 100 µL dos sobrenadantes coletados da placa do ensaio de estimulação *in vitro* das células sanguíneas foram aplicados e as placas incubadas por 2 h à temperatura ambiente. Depois de novamente lavadas, as placas foram incubadas com 100 µL/poço do anticorpo de detecção do kit diluído para 400 ng/mL em PBS-BSA por 2 h à temperatura ambiente. Após esta etapa, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL/poço de streptavidina-HRP, por 20 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após repetição da etapa de lavagem, as placas foram reveladas com 100 µL/poço da solução de substrato e a reação foi interrompida com 100 µL/poço de HCl 1N. A leitura das placas foi realizada como descrito na seção 3.12.

3.14 Ensaio de ligação de anticorpos

As cepas de pneumococo descritas na Tabela 12 foram selecionadas para avaliação da capacidade dos anticorpos gerados nos ensaios de imunização ligarem-se diretamente à superfície pneumocócica, mesmo na presença da cápsula polissacarídica. Para isso, as cepas foram cultivadas em placas BHI-ágar sangue a 37 °C por 18 h em atmosfera de CO₂. Depois, elas foram ressuspensas em meio THY, incubadas até DO 0,4-0,5 e centrifugadas (5418, Eppendorf) a 8000 rpm (5500 g) por 5 min. Os *pellets* foram lavados com PBS e ressuspensos no mesmo volume inicial. Os soros de cada grupo de animais foram reunidos e então adicionados a concentração de 5% em 95 µL da suspensão bacteriana de cada cepa, para posterior incubação por 30 min a 37 °C. Como controle negativo, as bactérias foram incubadas com o soro proveniente dos animais que receberam Alum. Então, as suspensões bacterianas foram lavadas com PBS e os *pellets* foram ressuspensos com 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado a FITC (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, CA, EUA) ou 100 µL do anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado Alexa Fluor 488 (Invitrogen), ambos diluídos de 1:100, por 30 min a 4 °C, protegidos da luz. Ao término da incubação, as suspensões bacterianas foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas com solução de fixação de células e mantidas a 4 °C protegidas da luz até a análise no citômetro de fluxo no Boston Children's Hospital, Cytomation MoFlo (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) ou no Instituto Butantan, FACSCanto (BD). Os dados foram analisados nos softwares FlowJo no Boston Children's Hospital ou Summit no Instituto Butantan.

Tabela 12 – Cepas de *Streptococcus pneumoniae* utilizadas nos ensaios imunológicos

Cepas	Sorotipo	Fonte	Ensaio
245/00	14	IAL	L; C; O
D39	2	BCH	L; C
P854	19F	UFG	L; C; O
TIGR4	4	BCH	L; C
P1079	1	UFG	L; C; O
A66.1	3	UAB e BCH	L; C; O
WU2	3	BCH	D; L; C; O

IAL - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil; BCH - Boston Children's Hospital, MA, EUA; UFG - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil; UAB - University of Alabama at Birmingham, AL, EUA. Ensaios: L - ligação de anticorpo; C - deposição de complemento; D - desafio de animais; O - opsonofagocitose.

3.15 Ensaio de deposição de complemento

Para realização do ensaio de deposição de complemento, as cepas de pneumococo descritas na Tabela 12 foram cultivadas inicialmente em placas BHI-ágar sangue a 37 °C por 18 h em atmosfera de CO₂ e depois cultivadas em meio THY até DO 0,4-0,5. As suspensões bacterianas foram centrifugadas (5415D, Eppendorf) a 4600 rpm (2000 g) por 5 min, os *pellets* foram lavados com PBS e ressuspensos em tampão opsono. Previamente, os soros de cada grupo de animais foram reunidos e aquecidos a 56° C por 30 min para inativar moléculas do sistema complemento. Após o aquecimento, os soros foram adicionados, a concentração de 5%, em 95 µL de suspensão bacteriana de cada cepa e a mistura foi incubada por 30 min a 37 °C. Como controle negativo, as bactérias foram incubadas com o soro proveniente dos animais que receberam Alum. Então, como fonte de moléculas do sistema complemento foi adicionado 10% de soro de camundongos C57Bl/6 não imunizados, que havia sido previamente coletado e congelado a -80 °C. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 min e as suspensões celulares foram lavadas e incubadas por 30 min no gelo, protegidas da luz, com anti-C3 de camundongo conjugado com FITC (MP Biomedicals) diluído 1:500 em PBS. Após duas etapas de lavagem com PBS, as amostras foram ressuspensas com solução de fixação de células e mantidas a 4 °C até o dia seguinte, quando foi realizada a leitura no citômetro de fluxo MoFlo e análise no software FlowJo, no Boston Children's Hospital ou FACSCanto e análise no software Summit no Instituto Butantan.

3.16 Ensaio de opsonofagocitose

O ensaio de opsonofagocitose foi realizado de acordo com Goulart et al. (2011), utilizando soro de animais que receberam a vacina celular pneumocócica lote F2407, que corresponde ao lote produzido pelo método contínuo com reciclo de células. Para isso, as cepas descritas na Tabela 12 foram cultivadas em placas BHI-ágar sangue por 18 h a 37 °C em atmosfera de CO₂. As células foram ressuspensas em meio líquido THY e cultivadas até atingirem DO 0,4-0,5, quando a concentração de bactérias atinge cerca de 10⁸ UFC/mL. O material foi centrifugado (5418, Eppendorf) a 8000 rpm (5500 g) por 5 min e lavado com PBS, depois os *pellets* foram ressuspensos em tampão opsono.

Os soros dos animais que receberam a vacina F2407 foram reunidos e aquecidos a 56 °C por 30 min para inativação das moléculas do sistema complemento. O mesmo foi feito

para os soros dos animais que receberam Alum, como controle negativo, e o soro anti-PspA, que foi usado como controle positivo (Goulart et al., 2011).

Alíquotas das suspensões bacterianas contendo $2,5 \times 10^6$ UFC foram incubadas, por 1 h a 37°C , com 2% dos soros inativados para complemento. Então, para cada soro estudado, as alíquotas foram separadas em 3 grupos (Tabela 13). As suspensões bacterianas foram adicionadas (ou não) de 10% de soro de camundongos C57Bl/6 não imunizados, como fonte de moléculas do sistema complemento, e incubadas a 37°C por 30 min. Depois, foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão opson. Nos grupos 2 e 3 (Tabela 13) o tampão opson continha 3 ng/mL de IL-17A (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA). Em seguida, todas as alíquotas receberam 4×10^5 células peritoneais de camundongos e a mistura foi incubada por 45 min a 37°C com agitação a 250 rpm (Gyromax 737R, Amerex instruments, Concord, CA, EUA).

As células peritoneais foram obtidas, no momento do uso, após lavagem com 5 mL de PBS da cavidade peritoneal de camundongos C57Bl/6 sacrificados e que haviam recebido 10 μg de ConA (Sigma-Aldrich) intraperitonealmente 48 h antes do ensaio de opsonofagocitose. As células peritoneais foram centrifugadas (5810R, Eppendorf) a 1000 rpm (201 g) por 10 min e ressuspensas em tampão opson para concentração de 8×10^6 células/mL.

Após a incubação das suspensões bacterianas com as células peritoneais, os tubos foram colocados no gelo para interrupção da reação. Depois, foi realizada diluição seriada das reações em PBS, e 10 μL das diluições 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 foi semeado em placas BHI ou TSA ágar-sangue. O ensaio de opsonofagocitose também foi realizado com alíquotas contendo 1×10^3 UFC, sendo que nesta condição, após as reações, as bactérias não foram diluídas antes do plaqueamento, devido à diluição prévia ao ensaio. As placas foram incubadas a 37°C em jarra de anaerobiose, e as UFC foram contadas após 12-20 h, de acordo com a cepa em estudo.

Tabela 13 – Ensaios de opsonofagocitose realizados.

Reagentes	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Complemento	X	-	X
IL-17A	-	X	X
Células peritoneais	X	X	X

X representa a adição do reagente, traço representa a ausência do reagente.

3.17 Preparação da cepa e ensaio de desafio de camundongos

Para realização dos ensaios de desafio foi empregado o modelo de sepse por aspiração de acordo com o protocolo previamente padronizado por Lu et al. (2010b). A cepa de *S. pneumoniae* utilizada foi WU2, que possui cápsula polissacarídica do sorotipo 3. Esta cepa foi plaqueada em TSA-ágar-sangue e incubada por cerca de 18 h a 37 °C em estufa com 5% CO₂ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Depois, foi cultivada em 50 mL de meio THY até DO 0,8. A cultura foi centrifugada (5415D, Eppendorf) a 10.000 rpm (9300 g) por 5 min e ressuspensa em 5 mL de meio THY fresco adicionado de 20% (v/v) de glicerol (Merck). Foram feitas alíquotas de 500 µL da suspensão bacteriana para congelamento a -80 °C. Após algumas horas de congelamento, a cepa foi titulada, para isso uma alíquota de 500 µL foi centrifugada (5415C, Eppendorf) a 14.000 rpm (16000 g) por 5 min a 4 °C, e depois ressuspensa em 500 µL de PBS esterilizado. Em seguida, foi feita a diluição seriada no mesmo tampão e as amostras diluídas plaqueadas em TSA-ágar-sangue. Após incubação de 18 h a 37 °C, as bactérias foram contadas e o título de UFC por mL foi determinado.

No dia do desafio, uma alíquota da cepa WU2 foi descongelada, centrifugada e ressuspensa em PBS conforme descrito acima no procedimento de titulação, a suspensão foi então diluída para concentração de 10⁷ UFC/mL. Em seguida, os animais foram anestesiados por aspiração de isoflurano, conforme descrito no procedimento de coleta de sangue, e receberam 100 µL da suspensão da bactéria WU2 viva, pela via intranasal, portanto 10⁶ UFC por animal. Diariamente, após o desafio os animais foram monitorados por uma semana, dentro de 3 a 4 dias ocorreu sepse e morte dos animais não protegidos. Os animais que estavam doentes, mas que não morreram, foram sacrificados pela aspiração de CO₂ e seu sangue foi plaqueado em TSA-ágar-sangue para a avaliação da presença do pneumococo na corrente sanguínea.

3.18 Avaliação da estabilidade do produto final

A estabilidade do lote F2407 frente à ação de agentes químicos e físicos foi avaliada para investigar o que poderia degradar os componentes e comprometer a habilidade da vacina para induzir a produção de anticorpos em animais e protegê-los em ensaios de desafio. Para isso, este lote passou pelos tratamentos descritos a seguir, e após cada um deles, uma amostra foi alíquotada e armazenada a 4 °C:

- diálise 1: para remoção da glicose presente no produto final, 2200 μL foram dialisados contra 500 mL de tampão Ringer-lactato sem glicose por 24 h a 4 °C sob agitação, empregando uma membrana para retenção de moléculas solúveis acima de 10 kDa (Thermo Fisher Scientific);
- periodato de sódio: solução de periodato de sódio (NaIO_4 - Sigma-Aldrich) foi adicionada à suspensão celular para concentração final de 9 mM e então a amostra foi incubada por 24 h sob agitação à temperatura ambiente;
- glicerol: a reação de oxidação do periodato de sódio foi interrompida pela adição de glicerol (Merck) para concentração final de 4,3% (v/v), sob agitação por 30 min, à temperatura ambiente;
- diálise 2: realizada como a diálise 1, mas neste caso para remoção de possíveis resíduos de periodato de sódio e de glicerol;
- fervura: amostra aquecida a 99 °C por 3 h;
- proteinase K: 1 μL foi adicionado para cada 8×10^7 células, sendo a atividade da enzima 0,6 mAU/ μL , de acordo com o fabricante (Qiagen Inc., Hilden, Alemanha). A reação enzimática foi incubada a 56 °C por 1,5 h.

Alíquotas foram coletadas após os tratamentos químicos e físicos e mantidas a 4 °C até a realização dos ensaios em animais e *in vitro*. As amostras produzidas e a sequência de tratamentos estão descritas na Figura 8.

Figura 8 – Sequência de tratamentos com agentes químicos e físicos e nome das amostras geradas.

O ensaio de imunização foi realizado com as amostras 2, 6, 10 da mesma maneira como descrito na seção 3.10, com a administração de apenas uma dose. A formulação das vacinas foi realizada com base nas diluições a que as amostras foram submetidas, de maneira

que a quantidade final de proteína administrada por animal fosse de 100 µg, como previamente descrito. A avaliação de anticorpos produzidos pelos animais, a indução de IL-17A e o desafio dos animais também foram realizados conforme descrito anteriormente.

O perfil de proteínas de todas as amostras tratadas foi avaliado por SDS-PAGE conforme descrito em 3.9. Foram feitos dois géis com 44 µg de proteína por poço, um deles foi corado com Coomassie (Simply Blue Safe Stain, Invitrogen) e o outro, contendo apenas as amostras administradas aos animais, foi transferido para membrana de nitrocelulose, corado com Ponceau (Sigma) e depois empregado para Western blot com o soro anti-WCV.

3.19 Análise estatística dos ensaios imunológicos

As concentrações de anticorpos e IL-17A presentes nos soros dos animais foram comparadas pelo teste de Mann–Whitney U. A sobrevivência foi analisada através do método de Kaplan-Meier e o teste de log-Rank para foi usado para comparação das curvas. A análise de redução do número de colônias no ensaio de opsonofagocitose foi realizada por ANOVA um fator, com teste Tukey para múltipla comparação. Todas estas análises foram feitas no software GraphPad Prism e valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processo descontínuo

Primeiramente, foram realizados os cultivos utilizando como estratégia o processo descontínuo. Estes cultivos foram realizados tal como previamente estabelecido em escala de 60 L para produção da vacina em condições de cGMP (Gonçalves et al., 2014; Apêndice D). Na Figura 9, estão apresentadas as médias e desvio padrão dos dados de concentração de glicose residual no reator, produção de lactato, acetato e biomassa em função do tempo para os seis cultivos descontínuos realizados.

Figura 9 – Crescimento celular, concentração de glicose residual, produção de lactato e acetato nos cultivos descontínuos de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200. Média e desvio padrão dos dados de 6 experimentos.

A concentração inicial de glicose no reator foi maior do que a adicionada ao meio, 20 g/L, pois o soytone e o extrato de levedura possuem carboidratos em sua composição, por isso em todos os cultivos a concentração inicial de glicose foi $24,8 \pm 0,3$ g/L, conforme a análise por HPLC. Os cultivos mostraram-se reprodutivos quando comparados entre si. Além disso, os resultados também foram bastante semelhantes aos obtidos em biorreator de 60 L (Apêndice B). Todos os cultivos apresentaram DO máxima entre 9 e 10, exceto um que foi interrompido em DO 6 para a coleta das células no final da fase exponencial, tal como

realizado nos cultivos de 60 L. Quando atingida a DO máxima, praticamente toda glicose presente no reator havia sido consumida (Figura 9), isto sugere que o microrganismo parou de crescer devido ao esgotamento da fonte de carbono, no caso a glicose, assim como visto para outros microrganismos cultivados em processo descontínuo, como por exemplo a depleção de glicose para *Escherichia coli* (Xu et al., 1999) ou sacarose para *Lactococcus lactis* (De Vuyst, Vandamme, 1992). A biomassa máxima obtida, medida pela técnica de massa seca, foi $4,15 \pm 0,33$ g/L, que foi similar à biomassa de outra bactéria láctica Gram-positiva *Lactobacillus sakei* (Leroy, De Vuyst, 2001), mas muito superior quando comparada com a de cepas encapsuladas do pneumococo cultivadas para produção de polissacarídeo, como sorotipo 14 com máximo de 1,13 g/L (Leal et al., 2011) e sorotipo 23F com máximo de 1,26 g/L (Gonçalves et al., 2002), possivelmente porque estas cepas possuem o gene *lytA*, que codifica para a principal enzima de autólise desta bactéria. Uma vez que os dados de crescimento celular reproduziram o processo previamente realizado em 60 L (Apêndice B), isto sugere que seria viável recolher as células a DO 10 para produção da vacina, o que representaria uma diferença de 1 g/L de massa seca, ou seja, haveria aumento do número de doses de vacina produzido por lote de cultivo.

A produção de lactato até a DO máxima de cultivo foi $19,0 \pm 0,7$ g/L e a máxima produção foi 20,3 g/L. Para acetato, a produção foi $10,3 \pm 1,1$ g/L até a DO máxima de cultivo, depois não passou de 11,3 g/L. A concentração de lactato foi similar a de outras bactérias Gram-positivas como o *Bacillus subtilis* (14 g/L) (Romero et al., 2007) e ao *Lactobacillus sakei* (20 g/L) (Leroy, De Vuyst, 2001) e também foi similar a outras cepas de pneumococo, por exemplo sorotipo 23F (20g/L) (Gonçalves et al., 2002) e sorotipo 14 (16,7 g/L) (Gogola-Kolling et al., 2014). As concentrações de lactato e acetato no instante 3,5 h, aproximadamente quando os cultivos atingiram DO 6, foram similares às concentrações encontradas nos cultivos realizados no biorreator de 60 L, em torno de 10 g/L e 4,5 g/L respectivamente. O mesmo ocorreu para todos os outros instantes do cultivo (Apêndice B).

Observou-se que a fase exponencial ocorreu entre 0 a 3 h de cultivo e a bactéria apresentou velocidade específica máxima de crescimento similar entre todos os cultivos descontínuos, em média $1,16 \text{ h}^{-1}$ (Figura 10). Esta velocidade foi muito superior quando comparada com outras bactérias, como por exemplo, $0,70 \text{ h}^{-1}$ para *Paracoccus versutus* sem controle de pH (Fuhrer et al., 2005), $0,66 \text{ h}^{-1}$ para *Lactococcus lactis* (Vuyst, Vandamme, 1992) e $0,56 \text{ h}^{-1}$ para *Escherichia coli* (Xu et al., 1999), mas foi similar a outras cepas de pneumococo, como por exemplo sorotipos 4, 8, 20 e 33F, que apresentaram $\mu_{\text{máx.}} = 1,1\text{-}1,2 \text{ h}^{-1}$ (Storai J, 2008), sorotipo 14 com $\mu_{\text{máx.}} = 1,20 \text{ h}^{-1}$ (Gogola-Kolling et al., 2014) e outra cepa sem cápsula que apresentou $\mu_{\text{máx.}} = 1,18 \text{ h}^{-1}$ (Liberman et al., 2008).

Figura 10 – Ln (DO) em função do tempo de todos os cultivos descontínuos

Regressão linear calculada no intervalo de 0 a 3 h.

A análise da morfologia bacteriana pela coloração de Gram foi realizada com algumas amostras para avaliação da pureza ao longo dos cultivos. Além da confirmação da pureza de todos os cultivos, observou-se a presença majoritária de cocos em cadeia curtas nas amostras iniciais e um aumento na presença de diplococos nas amostras finais de fermentação, conforme exemplificado na Figura 11.

Figura 11 – Microscopia óptica de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 em diferentes instantes do cultivo descontínuo após coloração de Gram.

Aumento de 1000X das amostras: A – após 1,5 h e B – após 4,5 h de cultivo.

Durante os cultivos, também foi estimada a quantidade de bactérias viáveis pela técnica tradicional de diluição seriada, plaqueamento em placas BHI-água e contagem de UFC. Todos os cultivos descontínuos apresentaram resultados similares e se correlacionaram com o aumento da DO (Figura 12). A quantidade de UFC, ao término de todos os cultivos descontínuos, foi em média $3,06 \times 10^9$ UFC/mL.

Figura 12 – Valores médios de UFC de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 em função da DO de 5 cultivos descontínuos.

4.2 Processo descontínuo alimentado

Cultivos descontínuos foram realizados por Kolling et al. (2009) e Liberman et al. (2011), com diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae*, para identificar a melhor concentração de substrato e a vazão a ser utilizada para o meio de cultura de alimentação no processo descontínuo alimentado de maneira que a concentração de células obtida fosse maior do que a apresentada nos processos descontínuos, além de não acumular substrato em concentrações inibitórias. Para isso, o grupo avaliou algumas concentrações diferentes de soytone, extrato de levedura e glicose para o meio de cultura EHS, assim como diferentes vazões de alimentação, mas sem alteração dos outros componentes (Liberman et al., 2011). Nesta tese, foram realizados cultivos descontínuos alimentados utilizando a melhor condição alcançada nesses trabalhos.

Na Figura 13, estão apresentadas as médias e desvio padrão dos dados de concentração de glicose residual, lactato, acetato, massa seca e DO no reator dos sete cultivos descontínuos

alimentados realizados. Os cultivos mostraram-se reprodutivos quando comparados entre si e apresentaram DO máxima entre 14 e 15, portanto 1,5 vezes maior do que o processo descontínuo. Apesar deste aumento, a concentração máxima de biomassa medida pela massa seca nos cultivos descontínuos alimentados foi $4,43 \pm 0,17$ g/L, portanto similar à alcançada no processo descontínuo.

Diferente do processo descontínuo, ainda havia uma pequena quantidade de glicose residual no reator nos cultivos descontínuos alimentados quando a DO máxima foi atingida, provavelmente devido à inibição do crescimento do microrganismo pela elevada concentração de ácidos produzidos, como observado para *Lactobacillus amylovorus* cultivado em processo descontínuo alimentado, em que o crescimento cessou, assim como a produção da bacterocina de interesse, devido às altas concentrações de lactato no reator (Callewaert, De Vuyst, 2000).

Figura 13 – Crescimento celular, concentração de glicose residual, produção de lactato e acetato nos cultivos descontínuos alimentados de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200. Média e desvio padrão dos dados de 7 experimentos.

Linha pontilhada indica o momento do início da alimentação à vazão de 0,5 L/h com meio de cultura 5 vezes concentrado para glicose e 4 vezes para extrato de levedura e soytone.

A produção de lactato nos cultivos descontínuos alimentados foi de $23,5 \pm 2,3$ g/L até a bactéria atingir a DO máxima de cultivo, e depois a produção máxima chegou a 28,4 g/L, portanto um aumento de 1,2 a 1,4 vezes na produção total de lactato em relação ao processo descontínuo. Este aumento na produção de lactato, quando comparados os processos

descontínuo e descontínuo alimentado, também foi verificado para a bactéria *Lactobacillus casei*, que aumentou de 112,5 g/L para 135 g/L, um aumento de 1,2 vezes (Ding, Tan, 2006). Por outro lado, a variação da produção acetato foi maior entre os cultivos descontínuos alimentados realizados, de 4,6 a 7,4 g/L, até a DO máxima de crescimento (6 h de cultivo), não obstante, esta produção foi 1,4 a 2,3 vezes menor do que a obtida no processo descontínuo.

Os cultivos descontínuos alimentados apresentaram velocidade específica máxima de crescimento similar entre eles, em média $1,20 \text{ h}^{-1}$, conforme ilustrado na Figura 14. Estes dados foram calculados no período de 0 a 3 h, portanto antes da fase de alimentação. Durante a fase de alimentação a velocidade específica de crescimento foi $0,63 \text{ h}^{-1}$ (3 a 4,5 h).

Figura 14 – Ln (DO) em função do tempo de todos os cultivos descontínuos alimentados

Regressão linear calculada no intervalo de 0 a 3 h.

A análise da morfologia bacteriana pela coloração de Gram foi realizada para algumas amostras dos cultivos descontínuos alimentados e, tal como observado nos cultivos descontínuos, também pareceu existir maior quantidade de cocos em cadeias curtas nas amostras iniciais do cultivo, enquanto que nas amostras intermediárias e finais do cultivo os diplococos foram predominantes (Figura 15).

Figura 15 – Microscopia óptica de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 em diferentes instantes do cultivo descontínuo alimentado após coloração de Gram.

Aumento de 1000X das amostras: A – após 1,5 h e B – após 5 h de cultivo.

A viabilidade das bactérias também foi estimada após diluição seriada e plaqueamento em placas BHI-ágar sangue. Os cultivos descontínuos alimentados apresentaram resultados similares entre si, e a média de bactérias viáveis obtida ao final dos cultivos foi de 2×10^9 UFC/mL, semelhante à dos cultivos descontínuos. Após atingir DO 11, a densidade continuou aumentando, sem aumento da viabilidade (Figura 16), o que poderia ser devido à presença de células mortas e/ou debris no caldo, além da diluição das células viáveis devido ao aumento do volume decorrente da alimentação.

Figura 16 – Valores médios de UFC de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 de 6 cultivos descontínuos alimentados.

4.3 Processo contínuo com reciclo de células

Diferente de microrganismos aeróbios para os quais é possível controlar a formação de ácidos em processo descontínuo alimentado, *S. pneumoniae* não realiza respiração, por isso seu metabolismo leva obrigatoriamente à produção de ácidos orgânicos (Figura 3). Por esta razão, foi realizado o processo contínuo com reciclo de células para remoção dos ácidos produzidos por essa bactéria e assim aumentar a biomassa produzida, pois supostamente esses metabólitos estariam inibindo o crescimento bacteriano ao final do processo descontínuo alimentado. As informações obtidas nos cultivos descontínuos alimentados foram utilizadas para estimar a vazão de reciclo no software AnaBio (Apêndice C). Como a taxa de diluição apontada pelo software para obtenção da maior biomassa foi de $0,672 \text{ h}^{-1}$, a execução do cultivo implicaria no preparo de grandes volumes de meio de cultura para alimentação e seria de difícil manuseio, por isso processos diferentes do previsto na simulação do software foram realizados, objetivando identificar uma condição alternativa para a obtenção da maior concentração de células, com a melhor remoção de metabólitos e com o menor gasto possível de meio de cultura. Além disso, todos os cultivos foram realizados até a bactéria atingir a DO máxima de crescimento, portanto foram interrompidos sem que se estabelecesse o regime permanente.

4.3.1 Condição 1 para o processo contínuo com reciclo

A Figura 17 apresenta os dados de DO, concentração de massa seca e concentrações de glicose residual, lactato e acetato no reator do primeiro processo contínuo com reciclo de células realizado. Neste processo, após 3 horas de batelada, iniciou-se a remoção de 6,5 L do caldo fermentado e o retorno das células para o reator após microfiltração tangencial utilizando o sistema de fibras-ocas, depois o volume final no reator foi completado para 10 L com meio de cultura fresco. Após a remoção do caldo fermentado e reposição com meio de cultura fresco, iniciou-se o processo contínuo com reciclo de células propriamente dito, ou seja, a remoção do caldo fermentado, retorno das células para o reator e entrada do meio de cultura fresco, sincronizados a uma vazão de 3 L/h, até o término do meio de cultura utilizado na alimentação. Este processo poderia ser caracterizado como um processo semicontínuo, devido à entrada e saída de meio de cultura do reator ser intermitente, ou seja, em operações separadas (Borzani, 2001), como visto no cultivo de *Gluconobacter oxydans* para a produção de dihidroxiacetona, composto muito usado na indústria farmacêutica e que inibe o

crescimento bacteriano durante sua síntese (Bauer et al., 2005). Entretanto, normalmente neste tipo de processo semicontínuo, diferentemente do que foi feito aqui, não é previsto o retorno das células ao reator, e também não ocorre a etapa de operação contínua após remoção de meio de cultura contendo os metabólitos inibitórios. Esta estratégia mista de operação, intermitente e contínua, foi escolhida devido ao fato de que, em torno de 3 h de cultivo, a concentração de ácidos orgânicos estava relativamente alta, em média 9,22 g/L no total ($5,86 \pm 0,25$ g/L de ácido láctico e $3,37 \pm 0,54$ g/L de acético) e esta operação permitiria sua remoção imediata para então iniciar-se o processo contínuo.

Figura 17 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 1 de cultivo contínuo com reciclo de células de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Linha pontilhada indica o momento da remoção do caldo fermentado e reposição com meio de cultura fresco, em seguida o início do processo contínuo com reciclo de células à vazão de 3 L/h, empregando o mesmo meio de cultura da batelada.

A condição 1 de cultivo contínuo com reciclo atingiu DO máxima de 20, ou seja, 2 vezes maior que a DO máxima obtida no processo descontínuo e cerca de 1,5 vezes maior que a do descontínuo alimentado. Em torno de 6 h de cultivo a concentração de glicose residual no reator estava aproximadamente 0 g/L, porém as células ainda apresentavam crescimento, conforme verificado pelo aumento da DO e da massa seca. Isto indica que o sistema não tinha atingido o regime permanente e sugere que as células estavam usando toda a glicose fornecida no meio de alimentação, além de possivelmente outros compostos do meio, para obtenção de energia para divisão celular. Adicionalmente, o esgotamento da glicose coincidiu com a

diminuição da concentração de lactato após 6 h de cultivo, o que indica a diminuição da atividade da via glicolítica, já que o lactato é o principal produto final desta via metabólica no pneumococo. Esta queda também poderia ser explicada pela possível conversão do lactato em piruvato para reciclar o NAD⁺ e gerar energia através da formação de acetato a partir do piruvato, devido à falta de glicose no reator. Outra possibilidade para a diminuição do lactato seria a diluição dos metabólitos no interior do biorreator devido à vazão constante do reciclo, o que reforçaria a hipótese de que o lactato não estaria mais sendo produzido neste período, já que a concentração não se manteve constante. Estas hipóteses são corroboradas pelo fato de que a concentração de acetato foi constante no biorreator durante o reciclo, como pode ser visto na Figura 17, portanto ainda estava ocorrendo a formação deste metabólito na mesma proporção em que estava sendo removido.

A concentração máxima de lactato no reator foi menor do que para os outros tipos de processos, 15,5 g/L, cerca de 1,8 vezes menor em relação ao processo descontínuo alimentado e 1,3 vezes menor em relação ao descontínuo, portanto pode-se inferir que o sistema ainda não tinha atingido a concentração de lactato inibitória para o crescimento do microrganismo. Já a concentração de acetato apresentou um perfil diferente do padrão observado para os outros processos: ela foi constante do início do reciclo até o final do processo, em torno de 3,5 g/L, três vezes menor do que a concentração máxima no processo descontínuo, portanto, provavelmente a vazão de reciclo foi suficiente para remover o acetato produzido e mantê-lo em níveis constantes no biorreator, devido à sua constante produção. Finalmente, a produção de massa seca foi 1,5 vezes maior do que nos dois processos descontínuo e descontínuo alimentado, atingindo concentração final no reator de 6,3 g/L.

4.3.2 *Condição 2 para o processo contínuo com reciclo*

A estratégia adotada para a condição 2 do processo contínuo com reciclo de células foi a mesma utilizada para o cultivo da condição 1, porém a partir de 5 h de cultivo a vazão de reciclo foi ajustada para 6 L/h na tentativa de contornar o problema do esgotamento da glicose observado na condição 1. No instante 3 h, foi feita a remoção de caldo fermentado e retorno das células ao reator, tal como realizado para a condição 1, porém esta remoção foi maior do que a pretendida, por isso houve uma queda da DO e aumento da concentração de glicose residual no reator decorrentes da maior diluição da cultura e do maior volume adicionado para completar o volume do reator para 10 L (Figura 18). A DO máxima atingida neste processo foi 24, cerca de 1,2 vezes maior do que a DO máxima da condição 1.

Figura 18 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 2 de cultivo contínuo com reciclo de células de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Linha pontilhada indica o momento da remoção do caldo fermentado e reposição com meio de cultura fresco, em seguida o início do reciclo de células à vazão de 3 L/h ($t=3h$). A linha tracejada indica o aumento da vazão do reciclo para 6 L/h ($t=5h$). A alimentação foi feita com o mesmo meio de cultura da batelada.

A concentração de glicose residual no reator ficou próxima de 0 g/L após aproximadamente 6,5 h de cultivo, ou seja, o aumento da vazão de 3 L/h para 6 L/h no instante 5 h retardou, mas não foi suficiente para impedir o esgotamento da glicose. A concentração de lactato no reator manteve-se entre 15,5 e 16 g/L de 6 h até o final do cultivo, e o esgotamento da glicose ocorreu às 6,5 h, enquanto que a interrupção do crescimento aconteceu às 7,5 h de cultivo. Isto sugere que o lactato estava sendo produzido constantemente, pois não houve declínio da concentração mesmo com a elevada vazão do reciclo de 6 L/h. Além disso, a glicose fornecida pelo meio de alimentação, entre 5 e 7,5 h de cultivo, provavelmente foi suficiente para suprir a demanda para o crescimento celular, visto que a biomassa aumentou até 7,5 h, portanto, a partir deste momento, a glicose poderia ter se tornado insuficiente. Outra possibilidade para a interrupção do crescimento seria a falta de outro nutriente importante como, por exemplo, algum aminoácido. A concentração de acetato no reator atingiu o valor máximo de 3,8 g/L em 3 h de cultivo, manteve-se estável em torno de 3 g/L até 5,5 h e diminuiu até 2 g/L ao final do processo. Provavelmente, a partir de 5,5 h, o acetato estava sendo produzido em uma velocidade menor do que a de retirada de meio. Finalmente, a biomassa produzida na condição 2 do processo contínuo com reciclo de células,

medida pela massa seca, foi 7,6 g/L, cerca de 1,2 vezes maior do que no processo antecessor, o mesmo aumento observado para a DO.

4.3.3 *Condição 3 para o processo contínuo com reciclo*

A fim de evitar o esgotamento da glicose quando altas concentrações celulares são atingidas e retirar maior quantidade de ácidos orgânicos do sistema, as condições do processo contínuo com reciclo de células foram novamente alteradas. Assim, a estratégia adotada na condição 3 dividiu-se em duas fases de reciclo. A primeira fase foi semelhante à realizada nas condições 1 e 2, ou seja, no instante 3 h foi iniciada a remoção do caldo fermentado com retorno das células ao reator e reposição com meio de cultura fresco, depois foi iniciado o processo contínuo com reciclo de células à vazão de 3 L/h. A segunda fase da condição 3 de cultivo foi realizada no momento 5 h e consistiu em uma nova etapa de remoção do caldo fermentado, retorno das células e reposição com meio de cultura fresco, para em seguida retomar o reciclo de células à vazão de 6 L/h. Além disso, na alimentação desta segunda fase foi empregado meio de cultura duas vezes mais concentrado em glicose, extrato de levedura e soytone do que o meio de cultura utilizado na primeira fase.

Na primeira fase do cultivo feito na condição 3, após 3 h, a concentração de glicose foi um pouco superior ao instante anterior, devido à remoção do caldo fermentado e a reposição com meio de cultura fresco, e a DO praticamente permaneceu a mesma, devido à maior diluição das células presentes no reator (Figura 19). Nesta primeira fase, a concentração de lactato no interior do reator diminuiu 1,5 g/L logo após completar o volume com meio fresco, enquanto que na condição 1 de cultivo ela permaneceu inalterada e na condição 2 diminuiu 2,5 g/L. Estas pequenas diferenças entre os cultivos nesta fase ocorreram devido às diferenças dos volumes removidos.

Figura 19 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 3 de cultivo contínuo com reciclo de células de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Linhas pontilhadas indicam as fases deste cultivo. No instante $t = 3$ h, foi realizada a remoção do caldo fermentado e reposição com meio de cultura fresco, em seguida o início do reciclo de células à vazão de 3 L/h. No instante $t = 5$ h, foi feita uma nova remoção do caldo fermentado e reposição com meio de cultura 2 vezes mais concentrado em glicose, extrato de levedura e soytone, em seguida, iniciou-se o reciclo de células com o meio concentrado à vazão de 6 L/h.

Na segunda fase, pretendia-se retirar também 6 L de caldo fermentado do reator, como foi realizado na primeira fase, mas isso não foi possível devido à alta concentração celular que reduziu a vazão de saída do permeado da fibra-oca e acarretou em um longo período de tempo para esta remoção. Assim, esta etapa foi interrompida após a retirada de 4,5 L de caldo fermentado, seguida da reposição com o mesmo volume de meio de cultura fresco, uma vez que esta operação deveria ser realizada no menor tempo possível para não provocar estresse às bactérias durante a concentração celular.

Como mostra a Figura 19, no instante 5,75 h, a concentração de glicose residual no reator aumentou consideravelmente, de 4,5 g/L para 15,5 g/L, por isso é possível dizer que a reposição do substrato no interior do reator foi atingida com sucesso nesta segunda fase do reciclo. No entanto, a remoção do lactato não foi satisfatória, pois diminuiu apenas 2,2 g/L, resultando em 11,2 g/L de concentração de lactato no reator. A concentração de lactato continuou a aumentar até 20,5 g/L, quando não houve mais crescimento celular, conforme avaliação pela DO, sendo esta a maior concentração de lactato no reator obtida entre os cultivos contínuos com reciclo de células realizados. Além disso, esta concentração de lactato

foi semelhante às obtidas nos cultivos dos processos descontínuos no momento em que cessou o crescimento bacteriano. A elevada concentração de lactato pode ter sido ocasionada pela ineficiência da condição 3 para remover este metabólito, visto que o cultivo 2 teve maior produção total de lactato, porém menor concentração no reator, conforme será detalhado adiante na seção 4.4. Outra possibilidade seria que o meio de cultura duas vezes mais concentrado utilizado para alimentação teria levado ao aumento da produção de lactato, como estudado para *Enterococcus faecalis*, que na presença de uma concentração 4 vezes maior de extrato de levedura, esta bactéria aumentou a produção e, consequentemente, a concentração de lactato no reator em mais de 10 g/L e a produtividade volumétrica para lactato em 5 vezes (Wee et al., 2004).

Para o acetato, este cultivo também apresentou um perfil cinético diferente dos dois cultivos anteriores, pois alcançou a maior concentração de acetato no reator, 6,3 g/L, e a maior produção total entre todos os cultivos anteriores dos 3 processos realizados (seção 4.4). Isto poderia ser explicado pelos substratos mais concentrados presentes no reator que poderiam ter estimulado a produção de acetato, assim como suposto para o lactato. Após as duas fases de remoção do caldo fermentado e reposição com meio de cultura fresco realizadas na condição 3 de cultivo, a concentração de acetato no interior do reator manteve-se constante, ou seja, a produção provavelmente ocorreu na mesma velocidade da remoção.

A DO máxima atingida neste cultivo foi 21,5, menor do que a obtida na condição 2 de cultivo contínuo com reciclo, provavelmente porque a quantidade total de 25,9 g/L de ácidos presente no reator (lactato 20,5 g/L e acetato 5,3 g/L) foi inibitória para o crescimento celular, pois aparentemente os nutrientes, tal como a glicose, estavam em concentrações suficientes para o crescimento desta bactéria. Para este processo, a massa seca não foi determinada.

4.3.4 Condição 4 para o processo contínuo com reciclo

Na condição 4 do processo contínuo com reciclo de células, optou-se, com base nos resultados anteriores, em empregar dois meios de cultura para o reciclo, sendo o segundo deles 1,5 vezes mais concentrado em glicose, extrato de levedura e soytone, além de avaliar vazão de reciclo aproximada a sugerida pela simulação no AnaBio. Assim, foi planejado iniciar o reciclo com uma vazão de 7 L/h quando a DO atingisse 4,0, sem a etapa de remoção do caldo fermentado e reposição com meio de cultura fresco realizada nos processos anteriores, e quando a DO atingisse 12, seria então iniciado o reciclo com o meio de cultura 1,5 vezes mais concentrado.

Na Figura 20 estão representadas a DO, a massa seca e as concentrações de glicose, lactato e acetato no reator referente aos 3 cultivos realizados utilizando a condição 4 do processo contínuo com reciclo de células. É possível verificar que, entre os instantes 3 e 3,5 h, todos os cultivos tinham atingido $DO \geq 4,0$, portanto, neste momento, iniciou-se o reciclo, com uma vazão média de 7,3 L/h, medida na saída do permeado da microfiltração tangencial, que foi a mesma na entrada do meio de cultura fresco no sistema de modo a manter o volume do reator constante. Neste momento de início do reciclo, não houve mudança no perfil de declínio da concentração residual de glicose, como aconteceu nas condições 1 a 3 do processo contínuo, nos quais foi feita a concentração da cultura seguida da reposição do volume com meio de cultura fresco antes do início da operação contínua, portanto não ocorreu o aumento da concentração de glicose antes do início do reciclo. Em seguida, entre os instantes 4,9 h e 5,3 h, passou-se a empregar o meio de cultura 1,5 vezes concentrado. Neste período, a concentração residual de glicose apresentou variação maior entre os cultivos, devido aos diferentes instantes de início da alimentação com o meio de cultura mais concentrado. Logo em seguida, a concentração de glicose continuou a diminuir no reator devido ao consumo pelas bactérias até 8 h de cultivo, quando a concentração começou a subir e foi atingida a DO máxima de $29,8 \pm 4,1$. Um dos cultivos realizados para a condição 4 foi um pouco mais lento na fase inicial, e isto repercutiu em DO final mais baixa do que a dos outros cultivos, gerando maior desvio padrão para as médias finais de DO e massa seca, como exibido na Figura 20. A DO máxima para a condição 4 foi 3 vezes maior do que a DO máxima do cultivo descontínuo e 2 vezes maior do que a DO máxima do cultivo descontínuo alimentado. Além disso, a DO obtida na condição 4 foi superior às obtidas nos outros cultivos do processo contínuo com reciclo de células deste trabalho, de 1,4 a 1,5 vezes maior. No entanto, quando comparada à DO máxima obtida em cultivos descontínuos e contínuos com reciclo de *Lactobacillus paracasei* por Xu et al. (2006), o aumento foi 6 vezes superior ao observado neste trabalho, chegando até DO 98,7, com $D = 0,6 \text{ h}^{-1}$ similar ao usado neste trabalho.

Similarmente ao aumento da DO, a concentração máxima de massa seca na condição 4 foi de $11,3 \pm 1,4 \text{ g/L}$, ou seja, 2,5 vezes maior do que as obtidas nos processos descontínuo e descontínuo alimentado, e 1,4 a 1,8 maior do que as das outras condições realizadas para o processo contínuo. A concentração máxima de massa seca obtida na condição 4 do processo contínuo com reciclo de células deste trabalho foi muito inferior a de outras bactérias lácticas homofermentativas, como por exemplo, 118 g/L para *Lactobaccillus delbrueckii* e 88 g/L para *Lactococcus cremoris* (Chang et al., 1994), ou de uma bactéria do mesmo gênero, 81,5 g/L para *Streptococcus cremoris* (Taniguchi et al., 1987). A diferença observada quando os dados

deste trabalho foram comparados aos obtidos com outras bactérias lácticas pode ser simplesmente devido ao fato de serem microrganismos diferentes, portanto com comportamentos e massas celulares distintos, além de condições de cultivos diferentes, como a taxa de diluição ou o sistema de filtração empregado. Também poderia indicar que a máxima concentração celular possível para *S. pneumoniae* RM200 ainda não tenha sido alcançada, por exemplo, devido ao acúmulo de metabólitos inibitórios do crescimento celular ou ao esgotamento de algum nutriente no meio de cultura.

Figura 20 – Crescimento celular e concentração de glicose residual, lactato e acetato no reator na condição 4 de cultivo contínuo com reciclo de células de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200. Média e desvio padrão dos dados de 3 experimentos.

O período de 0 h a 3,25 h corresponde à fase batelada. Linha pontilhada indica o início do reciclo, a uma vazão em média de 7,3 L/h empregando o mesmo meio de cultura da batelada. Linha tracejada, por volta de 5 h, o reciclo foi realizado à mesma vazão com meio de cultura 1,5 vezes mais concentrado para glicose, extrato de levedura e soytone.

A produção de lactato aumentou progressivamente durante todo o cultivo até atingir $21,9 \pm 0,9$ g/L em 8 h, exatamente no mesmo instante em que a concentração de glicose começou a aumentar dentro do reator. A produção de acetato aumentou até o final da batelada (3 a 3,25 h), depois a concentração no reator diminuiu com o início do reciclo devido à remoção do caldo, mas depois de 4 h de cultivo a concentração voltou a aumentar até atingir valor máximo de $5,52 \pm 0,42$ g/L em 7 h. Após 7,5 h, ocorreu novo declínio da concentração

de acetato no reator, que coincidiu com a diminuição da produção de lactato. Com base na diminuição do consumo de glicose e da produção de lactato e acetato na última hora de cultivo, sugere-se que as células do reator não estavam mais consumindo glicose e produzindo ácidos na mesma proporção de reposição de meio e remoção de caldo do reciclo e, portanto pararam de crescer, provavelmente porque a concentração dos ácidos no reator chegou a níveis inibitórios ao seu crescimento. Assim, o ideal neste momento seria aumentar a vazão de reciclo para intensificar a troca do caldo fermentado por meio de cultura fresco a fim de manter o crescimento celular, porém o sistema de microfiltração já estava operando no limite superior de pressão (10 psi), por esta razão este procedimento não foi realizado. Com base na oscilação das concentrações de glicose, lactato e acetato no reator, pode-se concluir que o sistema não havia chegado ao regime permanente, ou seja, condição em que as variáveis permanecem constantes, o que reforça a ideia de interrupção de crescimento devido a concentrações inibitórias de ácidos ou a ausência de outro nutriente.

Neste trabalho, não foi observado o fenômeno de incrustação da membrana de microfiltração tangencial, ocasionado pela adesão de células, ou formação de uma camada de gel ou de torta (Chen et al., 2004; Sablani et al., 2001), pois não ocorreu diminuição da vazão de permeado, como visto por Xu et al. (2006), que realizou procedimentos de desentupimento durante o cultivo contínuo com reciclo para poder prosseguir-lo. Porém, é possível que tenha ocorrido o fenômeno de polarização da membrana, etapa que precede a formação do gel ou de torta e consiste no acúmulo reversível do soluto na superfície da membrana ocasionando maior concentração do soluto na membrana filtrante do que na solução que está sendo filtrada (Bai, Leow, 2002; Yeh et al., 1999). O fenômeno da polarização diminui a remoção dos metabólitos inibitórios, o que poderia promover um ambiente inviável ao crescimento celular. Este problema não poderia ser contornado simplesmente pela utilização de um sistema com área maior de filtração que permitiria maior vazão. Outros estudos seriam necessários para evitar este fenômeno, por exemplo, a troca do material utilizado na membrana de microfiltração tangencial, que poderia diminuir as forças de atração ou aumentar as forças de repulsão; métodos químicos para modificação da superfície da membrana, ou métodos físicos como o uso de partículas que atraíam os solutos e não permitam a formação da camada, campos elétricos, ou ainda a promoção de fluxos turbulentos ou reversões periódicas do fluxo do permeado (Belfort et al., 1994).

A viabilidade das bactérias foi estimada após diluição seriada e plaqueamento em placas BHI-ágar sangue. Os cultivos da condição 4 apresentaram resultados similares entre si

e as medidas de UFC/mL correlacionaram-se bem com as DO (Figura 21). Ao final dos cultivos foram obtidas em média $1,65 \times 10^{10}$ UFC/mL bactérias viáveis.

Figura 21 – Valores médios de UFC de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 referentes aos 3 cultivos do processo contínuo com reciclo de células condição 4.

4.3.5 Comparação entre os cultivos do processo contínuo com reciclo

As diferentes condições realizadas do processo contínuo com reciclo de células foram analisadas para avaliação da melhor estratégia empregada, para isso foram comparadas a velocidade específica máxima de crescimento, a morfologia bacteriana, viabilidade, concentração de metabólitos e de glicose presente no reator e no filtrado, bem como a produção e consumo total destes componentes para cada cultivo contínuo realizado.

A velocidade específica máxima de crescimento foi semelhante em todas as condições do processo contínuo com reciclo de células, o valor médio foi $1,18 \text{ h}^{-1}$, o que era esperado, pois o cálculo foi feito com os dados obtidos até 3 h de cultivo, portanto ainda na fase de batelada, que foi realizada nas mesmas condições para todos os cultivos do processo contínuo (Figura 22). Durante o reciclo a velocidade específica de crescimento foi $0,63 \text{ h}^{-1}$ (3,5 a 5 h). O crescimento celular do cultivo F1306 foi um pouco mais lento na fase inicial, com $\mu_{\text{máx.}}$ $1,06 \text{ h}^{-1}$, o que gerou maior desvio padrão para as médias finais de DO e massa seca. Entretanto, este valor pode ser considerado dentro da variação de $\mu_{\text{máx.}}$ de todos os cultivos realizados, conforme avaliação estatística na próxima seção.

Figura 22 – $\ln(DO_{600nm})$ em função do tempo de todos os cultivos do processo contínuo com reciclo de células

Lote F0305 refere-se ao cultivo realizado com a condição 1 do processo contínuo com reciclo de células, F0905 refere-se ao cultivo da condição 2, F2905 refere-se ao cultivo da condição 3 e os lotes F1306, F2407 e F0708 referem-se aos cultivos da condição 4. Regressão linear calculada no intervalo de 0 a 3 h.

Assim como para os cultivos do processo descontínuo e descontínuo alimentado, foi realizada análise da morfologia bacteriana pela coloração de Gram para algumas amostras dos cultivos do processo contínuo com reciclo de células, e o mesmo padrão foi visualizado com predominância de cocos em cadeias nas amostras iniciais e maior presença de diplococos nas amostras intermediárias e finais do cultivo, conforme demonstrado anteriormente nas seções 4.1 e 4.2.

As concentrações de glicose, lactato e acetato foram medidas por HPLC em amostras do permeado do sistema de microfiltração tangencial durante a fase de reciclo. Os resultados de um dos cultivos contínuos com reciclo de células realizados de acordo com condição 4, o lote F0708, são apresentados na Figura 23. Tal como neste lote, todos os cultivos apresentaram concentrações no reator de lactato, acetato e glicose semelhantes às concentrações obtidas no permeado da microfiltração tangencial. Por esta razão, para todos os cálculos descritos adiante nesta seção e na seção 4.4, foram utilizados os valores obtidos para as concentrações do interior do reator. Entretanto, as pequenas diferenças entre as concentrações no reator e no permeado poderiam indicar que o efeito de polarização da membrana de microfiltração estaria ocorrendo, fenômeno sugerido na seção anterior.

Figura 23 – Concentração de lactato, acetato e glicose no meio de cultura presente no reator e no permeado do sistema de microfiltração tangencial da condição 4 do cultivo contínuo com reciclo de células, lote F0708.

Foram calculadas as massas totais de lactato e acetato produzidos e de glicose consumida ao longo do tempo, com base nas análises das concentrações mensuradas no reator, para cada cultivo realizado, permitindo a comparação entre as quatro condições do processo contínuo com reciclo de células, mostrada na Figura 24, onde pode-se observar que na condição 4 ocorreu a maior produção de lactato e acetato entre todos os cultivos contínuos realizados, além da maior DO e massa seca total obtida, o que repercutiu em maior consumo de glicose.

Figura 24 – Consumo total de glicose, produção total de lactato, acetato e massa seca e avaliação da DO nas 4 condições do processo contínuo com reciclo de células para cultivo de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

4.4 Comparação entre todos os processos realizados

Os parâmetros cinéticos foram calculados e então utilizados para comparação entre os três tipos de processos realizados: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células. Para esta comparação também foram utilizados os valores de glicose, acetato e lactato obtidos dentro do reator para cada processo fermentativo, além dos valores de concentração máxima de biomassa, conforme Tabela 14.

Tabela 14 – Comparação dos processos realizados para cultivo de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200. Média dos valores de $\mu_{\text{máx.}}$, DO máx., $X_{\text{máx.}}$, UFC máx. e das concentrações de acetato, lactato e glicose no reator no instante de DO máx.

Parâmetros	Unidade	Descontínuo (n=5)	Descontínuo alimentado (n=6)	Contínuo com Reciclo de Células			
				cond.1	cond.2	cond.3	cond.4 (n=3)
$\mu_{\text{máx.}}$ ^e	h ⁻¹	1,16	1,20 ^d	1,23	1,20	1,22	1,15 ^d
DO máx.	-	9,72	14,4 ^b	20,3	24,2	21,5	29,8 ^a
Viabilidade	UFC/mL	3x10 ⁹	2x10 ^{9d}	3x10 ⁹	3,4x10 ⁹	6,5x10 ⁹	1,7x10 ^{10c}
$X_{\text{máx.}}$ ^f	g/L	4,15	4,26 ^d	6,27	7,59	ND	11,28 ^a
Glicose	g/L	1,20	2,83 ^d	0,25	0,30	13,8	5,07 ^c
Acetato	g/L	10,3	6,20 ^a	3,47	2,14	5,34	4,21 ^a
Lactato	g/L	19	23,5 ^b	13,8	15,5	20,5	21,3 ^d

$\mu_{\text{máx.}}$ – velocidade específica máxima de crescimento calculada entre 0 e 3 h de cultivo; ND = Não determinado. Comparação entre os três processos com ANOVA e o teste Tukey para significância em relação ao descontínuo: ^a P < 0,0001; ^b P < 0,01; ^c P < 0,05; ^d sem diferença significativa; ^e avaliação utilizando maior n de cultivos: 6 descontínuos, 7 descontínuos alimentados e 6 contínuos; ^f avaliação utilizando menor n de cultivos: 2 descontínuos, 4 alimentados e 3 contínuos com reciclo.

4.4.1 Produção de biomassa

Os cultivos do processo contínuo com reciclo de células condição 4 alcançaram a maior DO entre todos os processos, assim como a maior massa seca no reator. O valor de DO máx. foi 3 vezes maior do que o alcançado no processo descontínuo, 2 vezes maior do que o do descontínuo alimentado e 5 vezes maior que o obtido no processo descontínuo realizado em escala de 60 L, que foi interrompido com DO de aproximadamente 6 para coleta das células e produção da vacina (Gonçalves et al., 2014). O processo descontínuo realizado neste trabalho foi melhor do que o processo descontínuo realizado em 60 L, pois as células foram coletadas na DO máxima de crescimento, o que resultou em densidade celular 1,5 vezes

maior. Porém, quando comparado com outras bactérias do mesmo gênero, a proporção de aumento da biomassa entre os processos descontínuo e contínuo com reciclo de células foi menor neste trabalho, por exemplo, Holst et al. (1985) obtiveram um aumento de 11 vezes na produção de massa seca de *Streptococcus lactis* no processo contínuo com reciclo em relação ao descontínuo, atingindo a concentração de 18,9 g/L, e Taniguchi et al. (1987) conseguiram um aumento de 35 vezes na produção de massa seca (calculada a partir da medida de DO) de *Streptococcus cremoris*.

No entanto, quando comparada a viabilidade entre os três processos realizados observa-se que não houve diferença estatística entre os processos descontínuo e descontínuo alimentado ($P = 0,3530$) e a condição 4 de reciclo apresentou diferença estatística em relação aos processos descontínuos ($P = 0,0150$). É possível observar ainda na Tabela 14 que a viabilidade celular das condições 1, 2 e 3 do processo contínuo com reciclo foram similares às obtidas nos processos descontínuos. As similaridades observadas na viabilidade dos diferentes processos devem-se à imprecisão do método de diluição seriada de bactérias e posterior plaqueamento, sugerindo que esta técnica não é apropriada para detectar pequenas diferenças entre os cultivos, além de ser de difícil execução e sem resultados imediatos. Isto indica a necessidade do estudo de outras técnicas que permitam determinar imediatamente quando cessa o crescimento celular para que então o cultivo seja interrompido e as células coletadas ainda vivas. Uma possível estratégia para isso seria o uso da citometria de fluxo, que vem sendo aplicada para o estudo de bioprocessos por alguns grupos. Resultados imediatos de viabilidade das bactérias presentes no reator poderiam ser obtidos utilizando diferentes fluorocromos que diferenciam células mortas de células vivas (Díaz et al., 2010).

O processo descontínuo alimentado apresentou maior DO que o descontínuo, cerca de 1,5 vezes maior, no entanto, não apresentou maior massa seca como seria esperado, pois a correlação massa seca x DO foi diferente para os dois processos, que será discutido adiante. A concentração de biomassa máxima medida pelo método da massa seca ($X_{m\acute{a}x.}$) para os 3 processos fermentativos não apresentou as mesmas proporções de aumento verificadas para DO máx. Para o processo contínuo com reciclo, os valores de $X_{m\acute{a}x.}$ variaram segundo a condição de cultivo empregada e foram superiores aos dois processos descontínuos, a condição 4 de cultivo foi cerca de 2,5 vezes maior do que os valores obtidos nos processos descontínuos. Visto que todos os processos contínuos apresentaram maior massa seca e DO que os dois processos descontínuos, pode-se concluir que esta estratégia favoreceu o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200, seja pela adição constante de nutrientes, seja pela remoção dos metabólitos inibitórios do crescimento.

Pode-se observar na Tabela 14 que os cultivos do processo descontínuo alimentado e do processo contínuo com reciclo de células nas condições 3 e 4 tinham glicose presente no reator quando o crescimento celular cessou, portanto outro fator impediu que o crescimento continuasse. Considerando a média dos valores da concentração de lactato no momento de DO máx. de todos os cultivos em que ainda havia glicose disponível no reator quando o crescimento cessou, poderia se inferir que a concentração inibitória do crescimento de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 seria $22,4 \pm 2,2$ g/L de lactato. Portanto, esta concentração deveria ser evitada para que não houvesse a inibição do crescimento, já que para a produção de uma vacina celular o objetivo é a obtenção da maior biomassa possível. Esta concentração inibitória foi inferior à encontrada por Taniguchi et al. (1987), que mostraram redução da razão $\mu/\mu_{\text{máx.}}$ para *Streptococcus cremoris* cultivado utilizando o processo contínuo com reciclo de células quando a concentração de lactato no reator atingiu 22 g/L e nenhum crescimento quando a concentração atingiu 35 g/L.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) foi determinada pela regressão linear dos dados de $\ln(DO)$ em relação ao tempo para todos os cultivos do instante 0 até 3 h, pois os cultivos encontravam-se na fase exponencial. Além disso, não foi observada fase lag ou de transição em nenhum dos cultivos realizados. Como a alimentação no processo descontínuo alimentado e o reciclo no processo contínuo foram realizados sempre após 3 h de cultivo, pode-se afirmar que a fase exponencial de crescimento ocorreu durante a etapa de batelada desses cultivos. Todos os processos apresentaram $\mu_{\text{máx.}}$ semelhante, sem diferença estatística entre eles, apesar de o processo descontínuo ter sido realizado com concentração do reagente soytone maior, 2% (m/v), enquanto que para os demais a concentração foi 0,5% (m/v).

Após as análises das concentrações de biomassa e glicose no reator, foram realizados os cálculos dos valores acumulados, ou seja, a massa total do que foi produzida ou consumida para cada cultivo, incluindo o que foi removido do reator durante amostragens ou reciclo. Os valores acumulados foram então empregados para construir as curvas médias em função do tempo dos cultivos de cada processo fermentativo realizado, além da curva de massa seca total produzida em função da glicose consumida (Figura 25), e com base nesta curva calculou-se o coeficiente angular de cada cultivo para determinação do $Y_{X/S}$ descrito adiante nesta seção.

Figura 25 – Comparação da DO, da quantidade total de massa seca produzida e de glicose consumida em função do tempo de cultivo e curva da massa seca produzida em função da glicose consumida nos 3 processos fermentativos realizados para cultivo de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Os cultivos do processo descontínuo alimentado apresentaram DO similares às do processo descontínuo até 4 h de cultivo, depois a DO de cultivo do processo descontínuo foi ultrapassada, pois neste momento ele encontrava-se entre a fase de declínio da velocidade de crescimento e o início da fase estacionária. Porém, para massa seca, a similaridade foi apenas até 2,5 h de cultivo, depois o processo descontínuo apresentou massa seca superior, no mesmo instante de tempo analisado, quando comparado aos processos descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células até o instante 4,6 h, momento em que o processo contínuo superou o descontínuo, cujo crescimento celular cessou.

4.4.2 Produção de ácidos orgânicos

As quantidades acumuladas de acetato e lactato produzidos ao longo do tempo também foram calculadas para todos os cultivos realizados. A Figura 26 mostra os gráficos da produção acumulada de acetato e lactato em função do tempo, da glicose consumida e da massa seca total produzida para comparação dos 3 processos fermentativos realizados. É possível observar que a maior produção de acetato foi obtida nos cultivos do processo descontínuo e contínuo com reciclo de células (Figura 26A), sendo o processo contínuo o que apresentou maior produção devido ao período de cultivo mais longo. A análise estatística mostrou que os valores máximos obtidos foram significativamente diferentes, conforme descrito adiante na Tabela 15. Não se obteve correlação linear quando analisada a produção de

acetato por glicose consumida, por esta razão foi calculado o fator de conversão global de glicose a acetato pela equação descrita na Tabela 8.

A massa total de lactato produzida, apresentada na Figura 26B, foi muito superior à massa total de acetato produzida para todos os cultivos dos 3 processos fermentativos realizados, por se tratar do principal metabólito do pneumococo. Novamente, a produção de lactato foi superior para o processo contínuo com reciclo de células, devido ao maior tempo de cultivo. Diferente do acetato, a produção de lactato foi superior para o processo descontínuo alimentado em relação ao processo descontínuo. Neste caso, obteve-se uma correlação linear entre a produção de lactato e glicose consumida, e então o coeficiente angular da reta foi usado para a determinação do fator de conversão de glicose a lactato ($Y_{lac/S}$), conforme será apresentado mais adiante na Tabela 15. A produção de lactato por grama de célula ($Y_{lac/X}$) foi determinada pelo coeficiente angular da reta de regressão linear da quantidade de lactato produzido em função da massa seca total, também exibida na Figura 26B.

Figura 26 – Comparação da produção de acetato (A) e lactato (B) em função do tempo, da glicose consumida e da massa seca total produzida para os 3 processos fermentativos de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Tendo em vista a grande produção de ácidos em todos os cultivos, foi avaliado o consumo da solução de NaOH 5 M, utilizada para o controle de pH, ao longo do tempo. A maior produção de ácidos e o maior tempo de cultivo do processo contínuo com reciclo de células repercutiu em maior consumo de NaOH, afim de se manter o pH em 7. A Figura 27 mostra que, no processo contínuo com reciclo de células, o consumo de NaOH intensificou-se por volta de 4 h, momento em que a inclinação da reta de consumo de NaOH em função do tempo foi maior, sendo que neste momento o reciclo já havia sido iniciado. Diferente dos outros processos, nos quais o consumo intensificou-se por volta de 3 h de cultivo. O coeficiente angular da reta média dos 3 cultivos realizados segundo a condição 4 do processo contínuo com reciclo de células foi 459,9 g/h entre 4 e 9 h, para o processo descontínuo foi

233,3 g/h entre 3 e 5 h e para o processo descontínuo alimentado foi 187,4 g/h entre 3 e 5,5 h. O elevado consumo de NaOH nos cultivos do processo contínuo com reciclo de células indica que, apesar da constante remoção dos metabólitos durante o reciclo, o pH continuou a cair durante o cultivo, ou seja, o sistema de microfiltração tangencial foi ineficiente para remoção dos ácidos na mesma velocidade de sua produção.

Figura 27 – Consumo da solução de NaOH 5M em função do tempo para os 3 processos fermentativos de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

A produção de formiato pelo pneumococo também foi avaliada em todos os cultivos realizados pela técnica de HPLC. Isto porque, em certas condições ocorre um deslocamento do metabolismo homofermentativo para um metabolismo misto, gerando outros metabólitos diferentes do preferencialmente produzido, o lactato (Yesilkaya et al., 2009). É possível observar na Figura 28A que o processo descontínuo alimentado teve maior produção de formiato do que o processo descontínuo, principalmente após 5,5 h momento em que há baixa concentração de glicose no reator para o processo descontínuo alimentado (4 g/L – Figura 13) e cessou o crescimento bacteriano no processo descontínuo. O processo contínuo com reciclo de células apresentou produção de formiato similar ao processo descontínuo alimentado, até o instante 6 h. Depois a produção aumentou e foi a maior obtida entre os 3 processos (Figura 28A). No entanto, quando comparados os processos contínuos com reciclo de células (Figura 28B), a condição 4 apresentou a menor produção de formiato e as condições 1 e 2 tiveram a maior produção. Provavelmente porque nestes dois cultivos ocorreu o esgotamento da glicose e, portanto menor fluxo glicolítico e por isso supõe-se maior conversão de lactato para

piruvato, depois a conversão deste em acetil-CoA com a liberação de formiato. Por fim, é possível a utilização do acetil-CoA na produção de acetato com rendimento de 1 ATP, conforme esquema da Figura 3, ou para composição da membrana da bactéria (Yesilkaya et al., 2009). Na condição 4, apesar da concentração relativamente baixa de glicose residual, supõe-se que a alimentação tenha sido capaz de manter o fluxo glicolítico elevado, e por isso a menor produção de formiato.

Figura 28 – Comparação da produção de formiato em função do tempo para os 3 processos fermentativos (A) e para as diferentes condições do processo contínuo com reciclo de células (B) realizadas para a bactéria *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

4.4.3 Relação entre massa seca e DO

A fim de avaliar a relação entre massa seca e DO, foi feita a média dos valores de massa seca para cada DO de todos os cultivos de um mesmo processo. Como visto na Tabela 14, os dois tipos de processos descontínuos apresentaram a mesma concentração de massa seca quando a DO máxima de cultivo foi alcançada, porém o descontínuo alimentado apresentou maior DO máxima que o descontínuo. Os resultados apresentados na Figura 29 mostram que o processo descontínuo alimentado apresentou coeficiente angular menor para a correlação entre massa seca e DO, com coeficiente de inclinação da reta média de 0,30 ($n = 5$ cultivos). Já os processos descontínuo e contínuo com reciclo de células apresentaram coeficientes de inclinação maiores: 0,42 ($n = 2$) e 0,37 ($n = 3$), respectivamente.

Figura 29 – Correlação entre massa seca e DO dos 3 processos fermentativos realizados para *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Processo descontínuo = vermelho; descontínuo alimentado = verde; contínuo com reciclo de células = azul; Equações das retas de cada processo estão apresentadas no rodapé da figura, bem como o coeficiente de correlação (R); No inserto está apresentada a mesma figura ampliada entre DO 0 e 5, que corresponde aos instantes 0 a 3 h de cultivo.

A diferença observada entre os dois processos descontínuos provavelmente ocorreu devido às diferentes concentrações de soytone no meio de cultura, 20 g/L no processo descontínuo e 5 g/L no descontínuo alimentado. É possível que as células tivessem composição um pouco diferente quanto ao conteúdo de nitrogênio incorporado, o que levaria a diferenças quanto à complexidade, permitindo que diferentes DO correspondessem à mesma massa seca. No entanto, o processo contínuo com reciclo de células, que também utilizou o meio de cultura contendo 5 g/L de soytone na fase de batelada tal como o processo descontínuo alimentado, apresentou correlação de massa seca e DO intermediária entre os dois processos descontínuos, isto porque o coeficiente angular foi determinado com base nos resultados de todo o cultivo e o processo contínuo foi o mais longo. Quando analisadas apenas as 3 primeiras horas de cultivo, inserto da Figura 29, que correspondem à fase de batelada, portanto fase em comum entre os 3 processos, exceto pelo meio de cultura mais concentrado em soytone para o processo descontínuo, observa-se maior inclinação da reta de correlação para o processo descontínuo (coeficiente angular = 0,48), sendo que os outros 2 processos foram similares (coeficiente angular = 0,35), corroborando a hipótese de que o meio com maior concentração de soytone repercutiria em maior correlação entre massa seca e DO. Outros trabalhos mostraram que diferenças na concentração de extrato de levedura em processos fermentativos descontínuos de *Enterococcus faecalis* geraram maior massa seca

(Wee et al., 2004), porém esta informação foi determinada pela medida da DO e correlacionada à massa seca, procedimento adotado pela grande maioria dos trabalhos para avaliar o crescimento celular. Por se tratar da medida da dispersão da luz, a DO pode variar de acordo com o tamanho, a densidade, a opacidade e a complexidade das células, por isso mudanças nas condições de crescimento poderiam ocasionar mudanças na fisiologia e composição do microrganismo e com isso alterar a relação DO e massa seca. Assim, este trabalho sugere que mudanças no meio de cultura inicial podem causar mudanças na bactéria e, portanto, uma única curva de calibração de DO e massa seca não poderia ser utilizada para cultivos realizados com condições e, sobretudo, com meios de cultura diferentes.

4.4.4 Análise estatística dos parâmetros obtidos nos diferentes processos

Por fim, os resultados obtidos da produção total de lactato, acetato e massa seca de cada cultivo, referentes aos processos descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células, foram analisados quanto à diferença estatística pelo método ANOVA um fator, e o teste Tukey para determinação de quais médias diferiam entre si. Na Tabela 15, estão apresentadas as médias destes valores, além de todos os parâmetros cinéticos e produtividades calculados para os 3 processos fermentativos. Constam também os resultados individuais referentes aos cultivos realizados nas outras 3 condições do processo contínuos com reciclo de células.

Tabela 15 – Valores médios obtidos para a produção total de massa seca, acetato e lactato, para os parâmetros cinéticos e produtividades referente os 3 processos fermentativos realizados para cultivo de *S. pneumoniae* cepa RM200.

Parâmetros	Unidade	Descontínuo (n=5)	Descontínuo alimentado (n=6)	Contínuo com reciclo			
				cond.1	cond.2	cond.3	cond.4 (n=3)
X_{total}^*	g	40,36	41,60 ^d	66,62	88,31	ND	122,7 ^a
S_{total}	g	240,4	324,2 ^d	422,8	681,9	678,8	906,3 ^a
$acet_{total}$	g	97,51	53,76 ^b	98,6	111,6	206,1	217,7 ^a
lac_{total}	g	185,6	237,8 ^d	330,0	550,9	512,4	882,7 ^a
$Y_{X/S}^*$	g massa seca/ g glicose	0,18	0,14 ^d	0,14	0,11	ND	0,17 ^d
$Y_{acet/S}$	g acetato/ g glicose	0,41	0,17 ^a	0,23	0,16	0,30	0,24 ^a
$Y_{lac/S}$	g lactato/ g glicose	0,77	0,73 ^d	0,79	0,80	0,78	0,97 ^a
$Y_{lac/X}^*$	g lactato/ g massa seca	4,27	4,80 ^d	4,99	5,87	ND	6,05 ^b
P_X^*	g massa seca/L.h	0,86	0,78 ^d	0,82	0,94	ND	1,23 ^c
P_{lac}	g lactato/L.h	3,79	3,76 ^d	4,02	8,37	10,6	13,8 ^a

ND = Não determinado; X_{total} = massa seca total produzida; S_{total} = massa total de glicose consumida; $acet_{total}$ = massa total de acetato produzido; lac_{total} = massa total de lactato produzido; $Y_{X/S}$ = fator de conversão de glicose à biomassa; $Y_{acet/S}$ = fator de conversão de glicose à acetato; $Y_{lac/S}$ = fator de conversão de glicose à lactato; $Y_{lac/X}$ = produção de lactato por grama de célula; P_X = produtividade volumétrica de células; P_{lac} = produtividade volumétrica de lactato. Comparação entre os três processos com ANOVA e o teste Tukey para significância em relação ao descontínuo: ^a $P < 0,0001$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,05$; ^d sem diferença significativa; * avaliação utilizando menor n de cultivos: 2 descontínuos, 4 alimentados e 3 contínuos com reciclo.

A Tabela 15 mostra, como já apresentado, que o processo contínuo com reciclo de células realizado na condição 4 foi o que rendeu a maior quantidade de massa seca final, $122,7 \pm 8,8$ g, sendo este valor 3 vezes maior que os dois processos descontínuos realizados. Como já mencionado, os valores de $X_{máx.}$ dos processos descontínuo e descontínuo alimentado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, e por isso também não houve diferença significativa para P_X , já que o tempo de fermentação também não foi muito diferente, cerca de 1 hora a mais para o processo descontínuo alimentado. Quando avaliado o fator de conversão de glicose em biomassa ($Y_{X/S}$) é possível verificar que nenhum dos processos apresentou diferença estatística significativa, ou seja, todos os processos apresentaram a mesma produção de células por grama de glicose consumida,

independentemente da estratégia de cultivo adotada. Calculando a média de $Y_{X/S}$ entre todos os processos realizados obteve-se o valor de $0,15 \text{ g massa seca/g glicose}$, que foi similar ao de outras bactérias lácticas como $0,11 \text{ g massa seca/g glicose}$ para *Lactobacillus delbrueckii* cultivado em processo contínuo com reciclo de células (Ohleyer et al., 1985) e similar aos valores apresentados por Aguirre-Ezkauriatza et al. (2010) para *Lactobacillus casei* em cultivos descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo sem reciclo, em média de $0,12 \text{ g massa seca/g glicose}$. E também foi similar a outras cepas de pneumococo, como a cepa Rx1Al^{kan}^R que apresentou $Y_{X/S} = 0,14 \text{ g massa seca/g glicose}$ (Lieberman et al., 2008).

O processo contínuo com reciclo de células realizado na condição 4, apesar do maior tempo de cultivo, que poderia diminuir a produtividade volumétrica, apresentou maior P_X em relação aos dois processos descontínuos, igual a $1,23 \text{ g/L.h}$, sendo a diferença estatisticamente significativa. Portanto, a maior produtividade seria uma das justificativas para a utilização do processo contínuo com reciclo de células para a produção da vacina celular pneumocócica. No entanto, esta produtividade em células não foi tão alta quando comparada com *Streptococcus pneumoniae* cepa 5287 em cultivo contínuo sem reciclo com $D = 0,8 \text{ h}^{-1}$, cujo P_X máximo foi $2,22 \text{ g/L.h}$ (Gogola, 2011) e com outra bactéria láctica como *Streptococcus cremoris* com P_X de $4,53 \text{ g/L.h}$, sendo esta produtividade volumétrica 19 vezes superior ao descontínuo (Taniguchi et al., 1987).

A produção total de acetato e lactato, apresentada na Tabela 15, foi calculada considerando a quantidade total presente no reator e a retirada nas amostragens e no reciclo, a média foi então obtida para cada processo fermentativo. A produção total de acetato foi significativamente menor nos cultivos descontínuos alimentados ($P < 0,01$) e maior no processo contínuo com reciclo de células condição 4, cuja produção foi $217,7 \pm 12,3 \text{ g}$ de acetato, valor estatisticamente diferente dos dois processos descontínuos ($P < 0,0001$). Porém, o fator de conversão de glicose em acetato ($Y_{\text{acet}/S}$) foi maior para o processo descontínuo, em média $0,41 \text{ g acetato/g glicose}$, quando comparado aos processos descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células ($P < 0,0001$). O valor de $Y_{\text{acet}/S}$ no processo descontínuo foi similar à cepa 5287 sorotipo 14 de pneumococo em meio complexo com $Y_{\text{acet}/S} = 0,35 \text{ g acetato/g glicose}$ (Gogola, 2011), mas foi superior ao de uma bactéria láctica cepa 30-A isolada de iogurte que apresentou $Y_{\text{acet}/S}$ igual a $0,17 \text{ g acetato/g glicose}$ em cultivo estático (Tashiro et al., 2011). Além disso, estes autores identificaram que bactérias lácticas de diferentes isolados que produziram outros subprodutos do metabolismo, como acetato ou etanol, apresentaram menores concentrações de lactato e menor $Y_{\text{lac}/S}$. Neste trabalho, o alto $Y_{\text{acet}/S}$ obtido para a bactéria *Streptococcus pneumoniae* no processo descontínuo pareceu não interferir no $Y_{\text{lac}/S}$,

já que ele foi similar ao $Y_{lac/S}$ apresentado no processo descontínuo alimentado em que se obteve o menor $Y_{acet/S}$.

Quando avaliada a produção total de lactato, não houve diferença estatística entre os dois processos descontínuos. Quando avaliados os valores obtidos para os processos contínuos com reciclo de células, a condição 4 apresentou a maior produção de lactato entre todos os cultivos realizados, 882,7 g, produção que foi também significativamente maior que a dos dois processos descontínuos ($P < 0,0001$). Esta elevada produção repercutiu em valores mais altos para os fatores de conversão de glicose em lactato, $Y_{lac/S} = 0,97 \pm 0,02$ g lactato/g glicose, que foram estatisticamente diferentes dos dois processos descontínuos ($P < 0,0001$). Este valor de $Y_{lac/S}$ do processo contínuo com reciclo foi próximo ao máximo teórico, ou seja, para cada 1 grama de glicose consumida quase 1 grama de lactato foi produzido. Isto assemelha-se a várias bactérias lácticas, muito utilizadas na produção comercial do lactato, em diferentes tipos de processos fermentativos, utilizando diferentes fontes de nutrientes, como revisado por John et al. (2007), por exemplo *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. paracasei* e *L. lactis* subsp. *lactis* que apresentaram $Y_{lac/S}$ igual a 0,91 g lactato/g glicose ou *Lactobacillus* sp. RKY2 que teve um $Y_{lac/S}$ de 0,93 a 0,97 g lactato/g glicose em cultivos contínuos com reciclo de células com taxas de diluição de 0,04 a 0,36 h⁻¹ (Wee, Ryu, 2009).

Quando analisada a produção de lactato por grama de células, observou-se maior eficiência das células em produzir lactato no processo contínuo com reciclo de células. Isto porque os cultivos da condição 4 apresentaram o maior $Y_{lac/X}$ entre todos os cultivos realizados, em $6,05 \pm 0,30$ g lactato/g massa seca, sendo que este valor apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,01$). Este valor foi superior ao obtido com a cepa encapsulada de pneumococo sorotipo 14 cultivada em processo descontínuo com meio complexo, que apresentou o valor de 5,32 g lactato/g massa seca (Gogola, 2011), mas foi inferior a outras bactérias lácticas como o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* em cultivo descontínuo que apresentou $Y_{lac/X} = 7,69$ g lactato/g massa seca (Parente et al., 1994).

A produtividade volumétrica de lactato (P_{lac}) foi alta para todos os cultivos realizados, quando comparada com outras bactérias lácticas conhecidas como excelentes produtoras de ácido láctico. Os processos descontínuos apresentaram $P_{lac} = 3,8$ g lactato/L.h, sem diferença estatística entre eles, e que foi similar a outras bactérias como *Enterococcus faecalis* em cultivos descontínuos com P_{lac} de 4,3 g lactato/L.h (Wee et al., 2004) e a cepa encapsulada 5287 de pneumococo que apresentou em processo descontínuo $P_{lac} = 2,45$ g lactato/L.h (Gogola, 2011). Enquanto que as células cultivadas em processo contínuo com reciclo de células deste trabalho apresentaram $P_{lac} = 13,8$ g lactato/L.h, sendo este o maior valor obtido entre todos os

cultivos realizados ($P < 0,0001$). A produtividade volumétrica de lactato para o processo contínuo trata-se de uma estimativa, caso o cultivo fosse mantido em condições de regime permanente para obtenção contínua de lactato no permeado da microfiltração. Este valor foi superior ao observado para o pneumococo encapsulado em cultivo contínuo com meio complexo que apresentou $P_{lac} = 11,9 \text{ g lactato/L.h}$ (Gogola, 2011). No entanto, foi inferior ao apresentado por outras bactérias lácticas como *Lactobacillus paracasei* cultivado em processo contínuo com reciclo de células com $P_{lac} = 31,5 \text{ g lactato/L.h}$ (Xu et al., 2006), *Lactobacillus helveticus* com $P_{lac} = 35 \text{ g lactato/L.h}$ (John et al., 2007) e *Lactobacillus rhamnosus* com $P_{lac} = 36 \text{ g lactato/L.h}$ também cultivado em processo contínuo com reciclo de células (Know, 2000).

4.5 Avaliação da morfologia das células por citometria de fluxo

Com a finalidade de analisar possíveis diferenças na morfologia das células ao longo do cultivo de maneira mais precisa do que a coloração de Gram, e com isso talvez explicar as diferenças de correlação entre DO e massa seca entre os cultivos realizados (Figura 29), o tamanho e a complexidade das amostras inativadas com paraformaldeído foram analisados por citometria de fluxo. As medianas da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) de luz para a população de células de cada amostra foram analisadas, medidas que correspondem respectivamente ao tamanho e à complexidade das células que compõem a população. Na Figura 30 foram plotados os valores médios de dois cultivos descontínuos em função do tempo de fermentação. Os valores de FSC e SSC aumentaram ao longo do cultivo e apresentaram boa correlação entre si, pois os perfis de ambas as curvas foram similares, pelo menos até 3 h, depois variaram na faixa de intensidade de luz de 5000 a 6000. Além disso, as medidas de FSC e SSC acompanharam os valores de $\ln(\text{DO})$ durante a fase exponencial. Esta similaridade entre as curvas de FSC, SSC e $\ln(\text{DO})$ foi previamente estudada para outros microrganismos como, por exemplo, o *Azotobacter uinelandii* (Allman et al., 1990). O tamanho de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200, detectado por esta técnica, variou durante o cultivo, pois as medianas de FSC variaram entre 1000 e 6000. Este tamanho foi intermediário, quando comparado ao *Cycloclasticus oligotrophus*, que teve FSC igual a 200, e *Escherichia coli*, com FSC igual a 8500 (Robertson et al., 1998). A intensidade de SSC também aumentou durante o tempo de cultivo, isto sugere que houve alteração na complexidade da população de células, o que pode corresponder a modificações na superfície celular ou no conteúdo celular, como verificado na formação de corpúsculos de inclusão em *Escherichia coli* recombinante (Lavergne-Mazeau et al., 1996).

Figura 30 – FSC, SSC e ln (DO) em função do tempo dos cultivos do processo descontínuo de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Média de FSC (tamanho) e SSC (complexidade) de 2 cultivos e média da ln (DO) de 6 cultivos.

As amostras dos cultivos descontínuos alimentados, inativadas com paraformaldeído, também foram analisadas por citometria de fluxo, a fim de detectar mudanças de tamanho ou complexidade das células ao longo do cultivo. As medianas das populações para FSC e SSC das amostras de 4 cultivos diferentes foram avaliadas. Na Figura 31, estão apresentados os valores de FSC e SSC desses 4 cultivos e a média dos valores de ln (DO) de todos os cultivos descontínuos alimentados realizados. Assim como observado nos cultivos descontínuos, os dados de FSC e SSC apresentaram boa correlação entre eles, pois os perfis das curvas foram semelhantes ao longo do tempo de cultivo. As medidas de complexidade e tamanho acompanharam os valores ln (DO) até 2,5 h de cultivo, porém após este tempo, as medidas se distanciaram, ocorrendo uma leve queda das medidas de FSC e SSC, mas que voltaram a subir ao longo do cultivo.

Figura 31 – FSC, SSC e ln (DO) em função do tempo dos cultivos do processo descontínuo alimentado de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Média de FSC (tamanho) e SSC (complexidade) de 4 cultivos e média da ln (DO) de 7 cultivos.

A técnica de citometria de fluxo, com detecção de FSC e SSC, permite a análise individual de cada célula que passa pelo feixe de luz, cuja dispersão é detectada pelo equipamento, gerando resultados de intensidade de luz da população de células presentes em determinada amostra, e com isso é possível a diferenciação de células intactas e debris. Daí sua vantagem perante outras técnicas, como massa seca e DO, que avaliam o conjunto de células como um todo em que não é possível segregar os debris, podendo gerar falsos resultados de alta densidade celular, quando a maioria desta massa pode ser composta de fragmentos celulares. Além disso, o uso de fluorocromos pode ampliar o espectro de informações que se obtêm através da citometria de fluxo. Porém, alguns autores sugerem que a relação FSC e tamanho da partícula não seja de reciprocidade, isto é, nem sempre quando um aumenta o outro também aumenta devido a mudanças na estrutura celular e composição química ou outras interferências (Julià et al., 2010), por isso alguns autores empregam modelos matemáticos para calcular o tamanho a partir dos dados de FSC e corrigir interferências intrapartículas (Koch et al., 1996), o que talvez seria necessário para confirmação dos resultados apresentados neste trabalho.

Como discutido na seção anterior, a correlação entre massa seca e DO variou de acordo com as condições e o meio de cultivo empregado. O tamanho das células poderia justificar massas secas iguais e diferentes DO dos processos descontínuo e descontínuo alimentado. Assim, os resultados de citometria de fluxo desses dois processos foram

comparados e verificou-se que o descontínuo alimentado apresentou células de tamanhos maiores do que o descontínuo, enquanto a complexidade foi aproximadamente igual (Figura 32). Portanto, neste caso, a hipótese seria de que as células maiores resultaram em maior DO, mas como a complexidade foi aproximadamente a mesma, as células apresentaram a mesma massa seca. Um fenômeno semelhante foi relatado para microalgas *Chlorella vulgaris*, em que mudanças no meio de cultura repercutiram em mudanças morfológicas, neste caso aumento do diâmetro das células, que produziram diferentes relações de massa seca e DO (Chioccioli et al., 2014). Neste trabalho, os autores utilizaram as técnicas de massa seca, DO, citometria de fluxo e compararam com a análise microscópica e contagem em hemocítmetro, eles observaram que os resultados de citometria de fluxo eram os que melhor se correlacionavam com a análise microscópica e que as outras técnicas produziram resultados subestimados de concentração celular.

Figura 32 – Comparação do tamanho (FSC) e da complexidade (SSC) entre as células de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 do processo descontínuo e descontínuo alimentado.

Paraformaldeído é amplamente utilizado na tecnologia de citometria de fluxo, e permite a fixação das células para posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo. Porém, aparentemente, a preservação de bactérias utilizando paraformaldeído pode aumentar a massa celular mensurada pela dispersão da luz, conforme demonstrado por Robertson et al. (1998) que encontrou diferenças em FSC de 68% para *Cycloclasticus oligotrophus*, uma pequena bactéria marinha, e de 15% para *Escherichia coli*, quando comparado do tempo zero até 49 dias de preservação. Uma estratégia para contornar este tipo de problema seria a realização da

citometria de fluxo em amostras frescas, recém-coletadas do biorreator, sem o uso do paraformaldeído. Para isso seria necessário ter um citômetro de fluxo próximo ao reator, porém, devido ao alto custo deste equipamento, os verdadeiros benefícios desta técnica no estudo de processos fermentativos devem ser avaliados. Outra vantagem da citometria de fluxo em relação às outras técnicas, como discutido na seção 4.4, é que as medidas de massa seca ou a contagem de UFC não produzem resultados imediatos, por isso não podem ser usadas para determinar quando o cultivo deve ser interrompido e as células coletadas, reforçando a importância da técnica de citometria de fluxo. Finalmente, a avaliação da DO em altas densidades celulares, como é o caso dos cultivos do processo contínuo com reciclo de células que atingiram $DO > 20$, representa um desafio por envolver diluições de até 100 vezes de misturas heterogêneas. Portanto, a citometria poderia identificar com maior precisão a biomassa viável presente no reator.

4.6 Separação celular e avaliação do produto final

Após o cultivo da bactéria, as células de alguns lotes foram coletadas para preparação do produto final, a fim de avaliar o impacto dos diferentes processos fermentativos sobre a qualidade da vacina. Inicialmente, a separação celular foi feita por centrifugação, pois isso permitiria a coleta de amostras em diferentes fases do crescimento da bactéria, enquanto o cultivo poderia prosseguir para permitir a obtenção dos dados dos processos. Assim, amostras de quatro cultivos do processo descontínuo e quatro do processo descontínuo alimentado foram coletadas em DO aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14 e as células separadas por centrifugação. Porém, após os procedimentos de centrifugação, lavagem com tampão Ringer-lactato, concentração para DO de aproximadamente 32, inativação com BPL e degradação do BPL, percebeu-se o aparecimento de um aspecto arenoso e a formação de pequenos grumos, principalmente nas amostras coletadas com $DO > 10$. Este aspecto foi diferente do homogêneo leitoso que normalmente o produto final apresentava, quando obtido em cultivo descontínuo em 60 L com células coletadas por microfiltração tangencial.

Para verificar se este aspecto arenoso foi consequência do processo descontínuo alimentado ou da metodologia de separação celular, foi realizado um novo cultivo descontínuo alimentado em que uma parte do caldo fermentado foi coletada por centrifugação e o restante foi coletado por microfiltração tangencial, utilizando o sistema de fibras-ocas. Constatou-se que somente o material coletado por centrifugação apresentou novamente este aspecto arenoso e grumado, diferente do material coletado por microfiltração tangencial, que apresentou

aspecto leitoso, como sempre observado nos cultivos de 60 L. Portanto, o problema não foi a estratégia de fermentação e sim a de preparação do produto final. Para evitar o aparecimento de grumos nas vacinas, que poderiam comprometer a qualidade, adotou-se a metodologia de microfiltração tangencial, já que a resposta imunológica à vacina celular pneumocócica preparada por esta metodologia está bem estabelecida (Gonçalves et al., 2014; Lu et al., 2010b).

A Figura 33 mostra fotografias das lâminas do produto final analisado por microscopia óptica após coloração das células pela técnica de Gram. Além do aspecto grumado, as células do produto final apresentaram uma coloração mais rosada após inativação com BPL quando comparada com a coloração roxa das células frescas coletadas durante o cultivo. Isto já havia sido observado nos lotes de 60 L, cujas células do produto final foram coletadas por microfiltração tangencial. Então, neste caso, a perda da coloração característica de bactérias Gram-positivas não aconteceu devido à metodologia de centrifugação, e sim à ação do inativante. Provavelmente, este inativante danifica de alguma maneira as paredes bacterianas fazendo com que o corante cristal-violeta se desprenda, permanecendo, portanto o último corante da técnica de coloração de Gram, a fucsina, sendo que aparentemente estes danos não comprometeram a morfologia, visto que a maioria das células tinha formato de diplococos por microscopia óptica. Esta perda do corante não foi observada quando as células foram inativadas com formol para medida de massa seca, pois neste caso a coloração roxa típica de bactérias Gram-positivas foi mantida (dados não mostrados). Também observou-se que a DO avaliada após a inativação com BPL geralmente foi inferior à DO mensurada previamente ao processo de inativação, o que corrobora a hipótese de perda de componentes celulares fazendo com que a DO se altere. Para caracterização do efeito do BPL sobre as bactérias, além do efeito conhecido de intercalação no DNA, outros estudos, como de microscopia eletrônica seriam necessários.

Figura 33 – Comparação das metodologias de separação celular realizadas após cultivo descontínuo alimentado até DO máx. e posterior inativação com BPL de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200 por microscopia óptica.

Lâminas do produto final de dois lotes, cujas células foram coletadas em DO 14, utilizando diferentes metodologias: A – lote F0911, células coletadas por centrifugação; B – lote F0603, células coletadas por microfiltração tangencial. Aumento de 1000X. Círculos vermelhos indicam fragmentos que talvez possam ter causado o aspecto arenoso e grumos.

O rendimento da microfiltração tangencial foi estimado para todos os cultivos em que as células foram coletadas com esta metodologia, conforme equação 17. Na Figura 34, estão apresentados os valores de recuperação das células após as etapas de microfiltração e lavagem para preparo da vacina. É possível observar que todos os lotes apresentaram rendimento de aproximadamente 100%. Os valores superiores a 100% podem corresponder ao fato de que a bactéria continuou a crescer durante as etapas de concentração, uma vez que ainda havia nutrientes no meio, e de lavagem, pois o tampão Ringer-lactato utilizado neste trabalho contém glicose. Outra possibilidade seria o fato de ter ocorrido algum erro na estimativa do volume final de produto.

Figura 34 – Estimativa das porcentagens de recuperação das células após a microfiltração tangencial para todos os lotes submetidos a esta metodologia utilizada para o preparo do produto final.

Amostras dos produtos finais obtidos após microfiltração tangencial e inativação das bactérias foram centrifugadas e o sobrenadante analisado por HPLC quanto à presença de glicose, lactato e acetato, da mesma maneira como realizada a análise para as amostras dos cultivos. Na Figura 35A, estão apresentados os valores de cada lote avaliado, e de alguns lotes produzidos em 60 L para fins de comparação, ordenados segundo a concentração de glicose. Era esperado pelo menos 2 g/L de glicose e 3 g/L de lactato, já que estas eram as concentrações destes componentes no tampão Ringer-lactato (Tabela 4). Na Figura 35B, está apresentada a DO mensurada após a inativação e a concentração de lactato presente no produto final de cada lote. É possível observar que, de maneira geral, quando a DO está alta, a concentração de lactato está baixa, e vice-versa. Isto sugere que as células consumiram o lactato presente no tampão Ringer-lactato durante as etapas de lavagem e inativação, pois esta bactéria é capaz de transformar lactato em piruvato para obtenção de energia na formação de acetato (Tanaii et al., 2008). Portanto, de modo geral, quanto maior a densidade celular do produto final, menor a concentração de lactato. Isto indica que a DO do concentrado de células e as condições de inativação são fundamentais para obtenção de um produto homogêneo para acetato, lactato e glicose. O que já era esperado, pois no estudo de inativação com BPL observou-se a falta de correlação das medidas de DO com a quantidade de células viáveis, o que repercutiu em alguns lotes com a presença de células vivas após a incubação com inativante, como o lote 004/10 e, conseqüentemente, a necessidade de aumentar o tempo de incubação (Gonçalves et al., 2014). Portanto, novamente a DO mostrou-se pouco precisa

para avaliações de suspensões celulares de alta densidade. Curiosamente, dois lotes apresentaram a concentração de glicose maior do que o esperado, que pode ser proveniente de erro no preparo do tampão Ringer-lactato, ou no preparo das amostras para a análise por HPLC, ou ainda as etapas de lavagens não foram suficientes para normalizar a concentração de glicose a 2 g/L, já que havia glicose no final do cultivo destes dois lotes de produto final.

Figura 35 – Comparação da DO, concentração de glicose, lactato e acetato dos produtos finais após a inativação das células de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Os produtos denominados com letra inicial “F” são provenientes dos cultivos em 10 L e coletados por microfiltração tangencial. Os 5 últimos lotes referem-se aos cultivos em 60 L, também coletados por microfiltração tangencial. Linhas pontilhadas indicam as concentrações esperadas: verde de glicose (2 g/L), azul de lactato (3 g/L) e rosa a DO (32).

Amostras do produto final dos cultivos que tiveram as células coletadas pela metodologia de microfiltração tangencial foram enviadas ao Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, pois o volume de produto final foi maior e, portanto, em quantidade suficiente para realização dos ensaios imunológicos e das análises de Controle de Qualidade. Na Tabela 16, estão apresentados os parâmetros analisados e os resultados obtidos. Quase todos os lotes avaliados apresentaram conformidade com os critérios de aceitação, os que diferiam foram excluídos dos ensaios imunológicos posteriores. Todos os lotes apresentaram porcentagem de proteína solúvel menor do que 15%, valor padronizado por Lu et al. (2010a), sendo este um critério de aceitação adotado pois indica que as células morreram devido à ação do BPL e não simplesmente porque ocorreu lise devido a ausência de nutrientes.

Tabela 16 – Resultados dos ensaios de controle de qualidade dos produtos finais provenientes de diferentes processos fermentativos, após microfiltração tangencial e inativação das células de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200.

Parâmetros	Critério de aceitação	F2802	F2103	F0603	F2703	F1704	F0305	F0905	F2905	F1306	F2407
Tipo de processo	-	D	D	A	A	A	C	C	C	C	C
Proteína no sobrenadante	0,7 - 3 mg/mL	1,58	1,11	1,24	1,11	1,27	0,46	0,83	1,94	1,64	0,80
Proteína total	> 7 mg/mL	12,1	9,81	9,44	8,12	8,75	6,94	8,69	16,9	14,1	8,87
% proteína solúvel	< 15%	13,0	11,3	13,1	13,7	14,5	6,63	9,55	11,5	11,7	9,01
Coloração de Gram	Diplococo Gram positivo	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP
DO *	NA	33,8	29,1	27,2	18,5	23,9	25,1	27,3	31,6	32,4	33,6
pH	5 – 7	4,9	4,8	5,1	4,8	5,1	5,0	5,0	5,3	5,3	5,0
Aspecto	Suspensão opalescente	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP
Endotoxina	< 125 UE/mL	73,2	10,9	51,5	7,18	19,9	57,4	4,10	178	195	47
Esterilidade	Ausência	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP

Todos os testes foram realizados no Serviço de Controle de Qualidade. * referente DO após inativação das células. D = processo descontínuo; A = processo descontínuo alimentado; C = processo contínuo com reciclo de células; AP = aprovado; NA= não aplicável, pois não foi estipulado um critério de aceitação. Em vermelho estão apresentados os valores que reprovaram os lotes.

Conforme apresentado na Tabela 16, os valores de concentração proteica total variaram entre os lotes, pois a diluição do produto concentrado antes da inativação por BPL foi realizada segundo a DO, que deveria ser aproximadamente igual a 32. Entretanto, devido à dificuldade de realizar a diluição de suspensões de células de maneira asséptica para corrigir a DO e devido aos problemas para avaliação da DO de misturas heterogêneas e de suspensões celulares com DO > 20, como já discutido anteriormente, a DO final do produto concentrado variou de 26 a 36 (dados não mostrados). Além disso, os valores de DO apresentados na Tabela 16, que variaram entre 18 a 34, foram obtidos após inativação do produto final, portanto relativamente menores quando comparados com DO produto final antes da inativação, conforme também discutido previamente, e esses valores são diferentes dos apresentados na Figura 35, pois foram avaliados em outro equipamento e por outro laboratório, neste caso o Serviço de Controle de Qualidade.

Os lotes que apresentaram alta quantidade de endotoxina foram avaliados para identificação do problema, e constatou-se que os grandes recipientes plásticos utilizados para armazenar o meio de cultura para reciclo eram a fonte de contaminação de endotoxinas, que não são retiradas na filtração esterilizante do meio de cultura. Devido à dificuldade de se obter materiais plásticos apirogênicos, utilizou-se garrações de vidro que foram despirogenizados em forno com temperatura de 250 °C, medida que resolveu o problema, visto que o lote seguinte não apresentou a contaminação com endotoxina.

4.7 Avaliação econômica das vacinas

Com base no conteúdo proteico do produto final dos lotes produzidos utilizando a metodologia de microfiltração tangencial para separação celular foi estimado o número de doses que esses lotes poderiam fornecer, bem como o custo com os principais reagentes utilizados no processo, que foram glicose, extrato de levedura e soytone. Estes reagentes foram escolhidos para o cálculo porque são os mais caros e empregados em maior quantidade, já as etapas anteriores e posteriores ao cultivo utilizaram quantidades similares de reagentes independentemente do tipo de processo.

Primeiramente, foi realizada uma estimativa do volume que seria obtido como produto final de acordo com as equações 18 e 19. Este volume estimado foi multiplicado pela concentração proteica, determinada pela metodologia de Kjeldahl, para estimar a massa proteica que foi obtida em cada cultivo. Então, esta massa proteica total foi dividida pela quantidade hipotética de proteína para uma dose humana, 300 µg, e com isso foi calculado o número de doses que cada lote produzido poderia fornecer. Essa possível dose humana foi escolhida para os cálculos neste trabalho, pois foi a dose intermediária utilizada no ensaio clínico fase I em humanos, realizado nos EUA e concluído em abril de 2013, em que se testaram as doses 100, 300 e 600 µg (ClinicalTrials.gov, 2014a). É possível observar na Tabela 17, que o número de doses obtido para os lotes do processo contínuo com reciclo de células foi muito superior ao dos cultivos descontínuos, principalmente para os cultivos referentes à condição 4, cujo número de doses foi de 4 a 7 vezes maior do que os lotes que tiveram bactérias coletadas em DO 6, ou 3 vezes maior do que os cultivos descontínuos que tiveram as bactérias coletadas em DO máxima, sendo estas diferenças significativas, com $P < 0,01$. Portanto, a estratégia utilizada nos cultivos descontínuos padronizados em 60 L com células coletadas a DO 6, cujos procedimentos foram os mesmos empregados para obtenção do lote F2103 deste trabalho, foi a menos rentável em número de doses.

Tabela 17 – Estimativa do volume do produto final, número de doses da vacina, custo com os principais nutrientes e tempo de processo para produção da vacina celular pneumocócica em escala de 10L utilizando diferentes processos.

	Descontínuo		Alimentado		Contínuo com reciclo de células			
	F2103	F2802	F2703	média (n=3)	F0305 (cond 1)	F0905 (cond 2)	F2905 (cond 3)	cond 4 (n=3)
DO coleta das células	6,5	10,1	6	13,8	20,3	24,2	21,5	29,8
Tempo total de processo (h)	6,25	6,91	5,28	8,10	9,46	10,9	12,5	12,9
Volume estimado de produto final (L)	2,39	2,95	1,85	3,51	8,14	8,97	5,13	9,27
Concentração proteica (g/L) do produto final (método Kjeldahl)	9,81	12,1	8,12	9,10	6,94	8,69	16,9	10,9
Proteína total obtida (g)	23,5	35,8	15,0	31,9	56,5	78,0	86,9	101,4
Nº hipotético de doses	78.153 ^a	119.278 ^a	50.073 ^a	106.470 ^a	188.305	259.831	289.674	337.961
Nº de doses por ano ($\times 10^6$)	3,28 ^a	5,01 ^a	2,10 ^a	4,47 ^a	7,91	10,9	12,2	14,2
Volume total de meio de cultura consumido (L)	10,5	10,5	8,82	9,65	30,15	42,06	39,56	52,47
Glicose utilizada (g)	210	210	202	285	603	841	1151	1342
Extrato de levedura utilizado (g)	210	210	195	262	603	841	1151	1342
Soytone utilizado (g)	210	210	49	66	151	210	288	335
Custo com reagentes/lote (US\$)	99,21	99,21	68,30	92,82	209,16	291,82	399,27	465,38
Custo com reagentes para produção de 1.000 doses (US\$)	1,27 ^b	0,83 ^a	1,36 ^b	0,87 ^a	1,11	1,12	1,38	1,38

Cond = Condição de cultivo; Em vermelho representado o maior número hipotético de doses obtido; Comparação estatística com o processo contínuo com reciclo de células condição 4: ^a P < 0,01; ^b sem diferença significativa.

Nas condições realizadas neste trabalho, foi necessária uma semana para a produção de cada lote, independente do tipo de processo realizado, quando considerado todo o tempo gasto com as etapas prévias como lavagem de materiais, preparo do meio de cultura e esterilização do biorreator, bem como as etapas posteriores de descontaminação de todo o sistema e materiais utilizados. Portanto, o número hipotético de doses foi multiplicado por 42 semanas para determinar quantas doses de vacina poderiam ser produzidas por ano para cada processo realizado. Este número de doses por ano foi 4 e 7 vezes menor para os processos descontínuo e descontínuo alimentado, respectivamente, com bactérias coletadas em DO 6, quando comparado ao processo contínuo com reciclo de células condição 4. Isto significa que o processo descontínuo levaria de 4 a 7 semanas para produzir o que o processo contínuo com reciclo de célula levaria apenas 1 semana. Quando comparado com os processos descontínuos com células cultivadas até DO máxima, o número de doses obtido no processo contínuo com reciclo de células em um ano seria 3 vezes maior, e portanto esses processos levariam 3 vezes mais tempo para produzir a mesma quantidade obtida no processo contínuo com reciclo.

Com base no volume de meio de cultura gasto em todos os lotes, incluindo o volume de meio usado para alimentação e reciclo, calculou-se a quantidade consumida em gramas de glicose, extrato de levedura e soytone em cada cultivo e o custo em dólar americano dispendido com estes reagentes para cada cultivo realizado (Tabela 17). É possível observar que o custo do processo contínuo com reciclo de células foi superior ao custo dos processos descontínuos, obviamente porque este processo utilizou maior quantidade de meio de cultura para atingir maior número de doses. O custo calculado por lote neste trabalho foi dividido pelo número hipotético de doses e o resultado foi inferior a 1 centavo de dólar para todos os processos realizados. Isto porque foi levado em consideração somente o gasto com os principais reagentes do meio de cultura. Vale ressaltar, que o custo para cada cultivo seria superior ao estimado neste trabalho, visto que muitos outros insumos foram utilizados, além de custos com mão de obra e toda infraestrutura necessária.

Além disso, quando calculado o custo para produção de 1.000 doses da vacina com base no gasto dos 3 reagentes principais do meio de cultura, observou-se que os processos descontínuos com células coletadas em DO máxima (DO = 10 no cultivo descontínuo e DO = 14 no descontínuo alimentado) apresentaram o menor custo por lote, que foi estatisticamente diferente do custo do processo contínuo com reciclo de células condição 4 ($P < 0,01$). Já o custo

com o processo descontínuo com células coletadas em DO = 6 foi similar ao processo contínuo com reciclo de células. Porém, o custo real do processo descontínuo seria superior se considerado o maior tempo gasto, que implica em maiores custos, além do maior número de operações de esterilização e limpeza para obter o mesmo número de doses que o processo contínuo com reciclo de células. Finalmente, mesmo na ausência de uma estimativa mais completa para cada lote, seria esperado que o custo da vacina celular pneumocócica fosse similar ao custo de outras vacinas celulares, como por exemplo, a vacina tríplice composta dos toxoides tetânico e diftérico purificados e acrescida da bactéria inativada *Bordetella pertussis* low, estimado em 13 centavos de dólar por dose (Dias et al., 2007).

4.8 Análise do perfil de proteínas

A análise do perfil de proteínas produzidas pela cepa RM200 de *S. pneumoniae* foi realizada por Western blot, utilizando diferentes anticorpos contra proteínas pneumocócicas recombinantes, com o objetivo de averiguar se esta cepa, quando cultivada por diferentes processos fermentativos, apresentaria diferenças no padrão de produção de proteínas específicas. Para isso, foi escolhido um lote de produto final de cada processo fermentativo, e todas as amostras foram aplicadas em um mesmo SDS-PAGE, com a mesma concentração final de proteína por poço. Anticorpos específicos foram utilizados contra as seguintes proteínas pneumocócicas: SP0785, SP2145, SP2070, SP1572, PdT e PspA (Tabela 10). Conforme apresentado na Figura 36, em todos os lotes produzidos, as proteínas específicas avaliadas estavam presentes, indicando que, provavelmente, a cepa sintetizou o mesmo conjunto de proteínas independentemente do processo fermentativo e da DO de crescimento em que as células foram coletadas. Para a proteína SP0785 era esperada massa molecular de 40 kDa (NCBI, 2014), porém foi observado um valor > 50 kDa, além de uma banda inespecífica em todos os lotes avaliados. As proteínas SP2145 e SP2070 apresentaram o tamanho esperado, de aproximadamente 70 kDa e 50kDa (NCBI, 2014), respectivamente. A proteína SP1572 migrou menos do que o esperado em SDS-PAGE, como previamente observado por Green et al. (2005), e se apresentou com massa molecular aparente de 21 kDa. Além da banda de 21 kDa, outras bandas de maior massa molecular foram observadas em todos os lotes avaliados, assim como observado por Green e colaboradores (2005), que as identificaram como possíveis dímeros e

tetrâmeros. No entanto, os tamanhos observados na Figura 36 foram um pouco diferentes dos oligômeros observados por esses autores. A proteína PdT apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 53 kDa (Berry et al., 1995), enquanto que PspA, apesar do tamanho predito de 65 kDa, a proteína migra em SDS-PAGE com uma massa molecular aparente de 84 kDa (Briles et al., 1998), que foi coerente com o resultado apresentado na Figura 36.

Figura 36 – Avaliação por Western blot de proteínas específicas presentes nos diferentes lotes da vacina celular pneumocócica proveniente de diferentes processos fermentativos.

Nos rodapés estão apresentados os nomes das proteínas usadas para a obtenção dos anticorpos específicos e no cabeçalho os números que representam os lotes: 1- lote controle 007/09; 2- F2103(descontínuo DO = 6); 3- F2802 (descontínuo DO = 10); 4- F2703 (descontínuo alimentado DO = 6); 5- F0603 (descontínuo alimentado DO = 14); 6- F0305 (contínuo com reciclo – condição 1, DO = 20); 7- F0905 (contínuo com reciclo – condição 2, DO = 24); 8- F2905 (contínuo com reciclo – condição 3, DO = 21); 9- F1306 (contínuo com reciclo – condição 4, DO = 25); 10- F2407 (contínuo com reciclo – condição 4, DO = 30).

Avaliou-se também o conjunto de proteínas presentes nos mesmos lotes avaliados quanto ao conteúdo de proteínas específicas. Na Figura 37, está apresentado o Western blot realizado com todos os lotes, utilizando o anticorpo obtido contra todas as proteínas do pneumococo, denominado anti-WCV. É possível observar que não houve diferença no perfil de proteínas, além de sugerir que todas as proteínas estão em quantidades similares para todos os lotes produzidos, já que foi aplicada a mesma quantidade de proteína total por poço.

Figura 37 – Avaliação por Western blot do perfil de todas as proteínas obtidas nos diferentes lotes da vacina celular pneumocócica proveniente de diferentes processos fermentativos.

Foi empregado soro anti-WCV. No cabeçalho os números que representam os lotes: 1- lote controle 007/09; 2- F2103(descontínuo DO = 6); 3- F2802 (descontínuo DO = 10); 4- F2703 (descontínuo alimentado DO = 6); 5- F0603 (descontínuo alimentado DO = 14); 6- F0305 (contínuo com reciclo – condição 1, DO = 20); 7- F0905 (contínuo com reciclo – condição 2, DO = 24); 8- F2905 (contínuo com reciclo – condição 3, DO = 21); 9- F1306 (contínuo com reciclo – condição 4, DO = 25); 10- F2407 (contínuo com reciclo – condição 4, DO = 30).

4.9 Avaliação imunológica das vacinas produzidas

Uma vez que diferentes estratégias de cultivo foram empregadas para a produção da vacina celular pneumocócica, tornou-se necessária a comparação entre os lotes obtidos quanto à capacidade dessas vacinas em estimular resposta imune em camundongos, para determinar se os lotes oriundos de processos fermentativos mais rentáveis seriam tão imunogênicos quanto os lotes previamente padronizados e produzidos em 60 L em condições cGMP.

Para isso, diferentes lotes foram utilizados em ensaios em modelo animal, previamente padronizados para a vacina celular pneumocócica (Lu et al., 2010b). Devido à grande quantidade de lotes de vacinas a serem testadas e às diferentes características a serem avaliadas, os lotes foram divididos em dois ensaios de imunização. No primeiro ensaio, diferentes tipos de processos fermentativos foram avaliados: dois lotes do processo descontínuo simples, sendo o lote F2103, em que as células foram coletadas em DO = 6,50, produzido nas mesmas condições dos cultivos em 60 L, e o lote F2802, em que as células foram coletadas na DO máxima (DO =

10,1); um lote do processo descontínuo alimentado (F0603) com células coletadas na DO máxima (DO = 14,3) e dois lotes do processo contínuo com reciclo de células que apresentaram densidades celulares distintas, o lote F0305 que se refere a condição 1 (DO = 20,3) e o lote F2407 que se refere a condição 4 (DO = 30,5). Como controle positivo, foi utilizado o lote 007/09, que foi produzido em cultivo descontínuo de 60 L com células coletadas em DO = 5,95 e foi o mesmo utilizado na padronização dos ensaios imunológicos (Gonçalves et al., 2014; Lu et al., 2010b). Como controle negativo, foi utilizado o adjuvante Alum na ausência de vacina. Com base na determinação do conteúdo proteico, pela metodologia de Kjeldahl, todas as vacinas foram diluídas para concentração de proteína de 500 µg/mL, e cada animal recebeu 2 doses de 100 µg de proteína + 200 µg de Alum cada, com intervalo de duas semanas.

4.9.1 Avaliação da resposta humoral

A Figura 38 apresenta os níveis de anticorpos do tipo IgG obtidos no sangue de animais, 12 dias após a segunda dose. Todas as vacinas se mostraram igualmente capazes de induzir a produção de anticorpos em camundongos após duas doses de imunização. Para todos os grupos, a quantidade de anticorpos obtidos foram estatisticamente diferentes do grupo que recebeu Alum como controle, com $P < 0,0002$, e similares aos ensaios previamente padronizados em que os animais também receberam 2 doses de 100 µg de proteína cada (Lu et al., 2010b). As vacinas F0305 e F2407 induziram níveis de anticorpos superiores aos obtidos com a vacina controle lote 007/09 ($P < 0,05$).

Figura 38 – Avaliação de anticorpos do tipo IgG induzidos pelas vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos.

As barras horizontais representam a mediana dos valores obtidos. Análise estatística utilizando o teste Mann-Whitney U para comparação com o controle negativo Alum (** $P < 0,0002$) ou entre os grupos indicados (* $P < 0,05$).

No segundo ensaio foram avaliadas as duas metodologias de separação de células realizadas, microfiltração tangencial e centrifugação, e duas diferentes temperaturas de armazenamento do produto final, 4 °C e -80 °C, para os dois processos descontínuos realizados, simples e alimentado. Para isso, foram utilizadas amostras de produto final dos seguintes cultivos: F0603, que foi produzido com processo descontínuo alimentado e que teve células coletadas utilizando o sistema de microfiltração tangencial, e após inativação, amostras deste produto final foram armazenadas em duas temperaturas diferentes 4 °C e -80 °C; F0911, também produzido em processo descontínuo alimentado, porém as células foram coletadas e lavadas por centrifugação; F2103, produzido em cultivo descontínuo simples, com células coletadas em DO = 6, utilizando o sistema de microfiltração tangencial e mantido a -80°C; F0410 também produzido em processo descontínuo simples, porém as células foram coletadas em DO = 6 por centrifugação. Neste ensaio de imunização, os animais receberam apenas uma dose de vacina, a fim de ressaltar possíveis diferenças entre os lotes. Como controle positivo, foi utilizado o lote 007/09 e como controle negativo apenas o adjuvante. Como demonstrado na Figura 39, todas as vacinas se mostraram igualmente capazes de induzir a produção de anticorpos em camundongos

após uma única dose. Para todos os grupos, os níveis de anticorpos obtidos foram estatisticamente diferentes do grupo que recebeu Alum como controle, com $P < 0,0001$. Visto que neste ensaio os animais receberam apenas uma dose de 100 µg de proteína, os níveis de anticorpos foram mais baixos (cerca de 5.000) quando comparados com os obtidos por Lu et al. (2010b), cujos níveis foram cerca de 50.000, e com o ensaio anterior (Figura 38), isto porque nesses ensaios os animais receberam 2 doses da vacina. Os resultados de imunização com uma dose apresentados aqui se assemelham aos resultados obtidos pela imunização com duas doses contendo 10 µg de proteína (Lu et al., 2010b).

Figura 39 – Avaliação de anticorpos do tipo IgG induzidos pelas vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos, utilizando diferentes metodologias de coleta de células e armazenadas em diferentes temperaturas.

As barras horizontais representam a mediana dos valores obtidos. Análise estatística utilizando o teste Mann-Whitney U para comparação com o controle negativo Alum (* $P < 0,0001$).

Com base na produção de anticorpos, é possível dizer que todos os lotes foram similares em estimular a resposta imune humoral em camundongos, e mantiveram os padrões de qualidade preconizados para os lotes produzidos em 60 L. Portanto, não houve alteração na potência das vacinas de acordo com os métodos de produção aplicados e tampouco quanto às diferentes temperaturas de armazenamento.

4.9.2 Avaliação da resposta celular - Produção de IL-17A

Conforme demonstrado por Lu et al. (2008), a presença de IL-17A é importante para a proteção de camundongos em ensaios de colonização por pneumococo. Foi verificado que a proteção contra a colonização é dependente de uma resposta por células do tipo Th17, em um processo independente de anticorpos. Por esta razão, as diferentes vacinas produzidas neste trabalho foram avaliadas quanto à capacidade de ativar as células sanguíneas extraídas de animais imunizados para produzir IL-17A, utilizando o ensaio de estimulação *in vitro*. Para isso, as células do sangue coletado dos animais imunizados, antes da separação do soro para análise da produção de IgG, foram utilizadas neste ensaio, e a vacina do lote 007/09 foi empregada para o estímulo *in vitro*.

A Figura 40 mostra que a produção de IL-17A pelas células sanguíneas oriundas dos animais imunizados com as diferentes vacinas foi muito similar ao grupo controle lote 007/09, cerca de 1 ng/mL. Apenas o lote F2407 induziu níveis superiores aos do lote 007/09 ($P = 0,0089$). Todos os grupos foram estatisticamente diferentes do grupo que recebeu Alum, com $P < 0,0001$. Isto sugere que todos os processos fermentativos renderam vacinas de qualidade similar quanto à capacidade de induzir resposta celular do tipo Th17.

Figura 40 – Avaliação dos níveis de IL-17A obtidos no ensaio de estimulação *in vitro* a partir do sangue dos animais imunizados com as vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos.

As barras horizontais representam a mediana dos valores obtidos. Análise estatística utilizando o teste Mann–Whitney U para comparação com o controle negativo Alum (** $P < 0,0001$) ou entre os grupos indicados (* $P = 0,0089$).

No ensaio seguinte, a indução da produção de IL-17A foi avaliada após estímulo das células sanguíneas dos animais que receberam apenas uma dose das vacinas produzidas em dois diferentes tipos de processo fermentativo (descontínuo simples e descontínuo alimentado), ou obtidas a partir de duas diferentes metodologias de separação e lavagem de células (microfiltração tangencial ou centrifugação), ou armazenadas em diferentes temperaturas. Conforme apresentado na Figura 41, todos os grupos apresentaram níveis de IL-17A estatisticamente diferentes do grupo que recebeu Alum como controle, com $P < 0,0002$. Apenas o grupo que recebeu a vacina F0603 estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi estatisticamente maior do que o grupo do controle positivo que recebeu o lote 007/09 ($P = 0,0433$). Os níveis de IL-17A, cerca de 1 ng/mL, também foram similares aos dos grupos que receberam 2 doses da vacina, que foram previamente apresentados na Figura 40.

Figura 41 – Avaliação dos níveis de IL-17A obtidos no ensaio de estimulação *in vitro* a partir do sangue dos animais imunizados com as vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos, com diferentes metodologias de separação celular e armazenadas em diferentes temperaturas.

As barras horizontais representam a mediana dos valores obtidos. Análise estatística utilizando o teste Mann–Whitney U para comparação com o controle negativo Alum (*** $P < 0,0002$) ou entre os grupos indicados (* $P = 0,0433$ e ** $P = 0,0279$).

Quando comparadas as metodologias de microfiltração tangencial e centrifugação, apenas os lotes do processo descontínuo simples (F2103 e F0410) apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles, com $P = 0,0279$, sendo que os animais do grupo F0410 apresentaram maior dispersão dos níveis de IL-17A. Este ensaio, apresentado na Figura 41, sugere que a vacina obtida utilizando o sistema de microfiltração tangencial teria levado à maior indução dos níveis de IL-17A do que a vacina obtida pelo método de centrifugação e, portanto as células coletadas através dos procedimentos de centrifugação ou de microfiltração tangencial poderiam ter gerado vacinas com propriedades imunológicas distintas. No entanto, a avaliação do conteúdo proteico total para estes lotes foi realizada utilizando metodologias distintas: Kjeldahl para o lote F2103 e Lowry para F0410, isto porque as vacinas obtidas por centrifugação não tinham volume suficiente para a realização da dosagem de proteína por Kjeldahl. Foi observado que a dosagem de proteína total utilizando kits que usam lise química seguida da metodologia de Lowry produziu resultados inferiores aos apresentados pela metodologia de Kjeldahl (dados não mostrados). Possivelmente isso aconteceu porque o método de Lowry é colorimétrico e mais

sujeito a interferências do que a metodologia de Kjeldahl, que se baseia na determinação de nitrogênio total após digestão da amostra. Portanto, é possível que os animais do grupo do lote F0410 tenham sido imunizados com uma dose menor da vacina. Para as demais comparações: diferentes temperaturas, diferentes processos fermentativos (simples ou alimentado), e microfiltração tangencial em relação à centrifugação para o processo descontínuo alimentado, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

4.10 Ensaios de ligação de anticorpos e deposição de complemento

A fim de estudar metodologias alternativas para avaliar a qualidade da vacina sem a necessidade de ensaios de desafio animal, outras técnicas amplamente utilizadas para determinação do potencial imunológico de vacinas proteicas e polissacarídicas foram avaliadas. Primeiramente, desejou-se averiguar a capacidade dos anticorpos produzidos contra a vacina celular pneumocócica (anti-WCV) de ligar-se aos antígenos de superfície do pneumococo que estão protegidos pela cápsula polissacarídica, ligação que poderia então levar ao reconhecimento deste patógeno pelo sistema imune. Para isso, diferentes cepas vivas encapsuladas de pneumococo foram utilizadas no ensaio de ligação de anti-WCV. Para avaliar esta ligação foi empregado um anticorpo contra a porção Fc de IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo FITC, então a fluorescência das bactérias marcadas por FITC foi detectada em citômetro de fluxo. Cepas dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 14 e 19F, descritas na Tabela 12, foram testadas neste ensaio e os resultados estão apresentados na Figura 42. Todas as bactérias testadas apresentaram intensidade de fluorescência superior a 10 unidades quando incubadas com anti-WCV, com porcentagem da população marcada superior a 60%. Bactérias que foram incubadas com soro dos animais que receberam apenas Alum apresentaram $\leq 5\%$ da população marcada. Estas observações foram similares aos resultados obtidos com anticorpos anti-PspA, que também foram capazes de se ligar à bactéria encapsulada (Campos et al., 2008).

Estes resultados sugerem, portanto, que anticorpos anti-WCV são capazes de se ligar a antígenos que estariam encobertos pela cápsula polissacarídica. Contudo, vale ressaltar que por se tratar de anticorpos contra o conjunto total de antígenos do pneumococo, o soro anti-WCV também contém anticorpos contra antígenos que provavelmente estariam expostos na superfície

bacteriana, projetando-se para fora da cápsula polissacarídica, como por exemplo, o antígeno PspA.

Figura 42 – Ensaio de ligação de anticorpos anti-WCV a *Streptococcus pneumoniae* de diferentes sorotipos.

Diferentes cepas pneumocócicas foram incubadas com soro anti-WCV e anti-IgG de camundongo conjugado a FITC. Soro dos animais que receberam Alum foi usado como controle negativo e está representado pela área cinza. O nome das cepas está especificado no topo de cada figura. A porcentagem da população marcada (> 10 unidades de intensidade de fluorescência) foi calculada para cada amostra e está indicada acima de cada pico.

Sabe-se que as cepas virulentas possuem uma cápsula polissacarídica que as protegem da fagocitose, mas que anticorpos anticápsula permitem que moléculas do sistema complemento se depositem sobre o pneumococo, promovendo assim a opsonização da bactéria, e com isso a fagocitose (Brown et al., 1982). Por isso, decidiu-se avaliar se anticorpos anti-WCV poderiam apresentar o mesmo efeito. Para isso, alguns dos soros dos animais imunizados com as diferentes preparações vacinais foram avaliados em ensaios de deposição de complemento sobre a superfície de cepas encapsuladas vivas de pneumococo. A Figura 43 mostra a porcentagem de células com intensidade de fluorescência maior que 10, determinada pelo citômetro de fluxo. É possível verificar que a proteína C3 depositou-se sobre a superfície de *S. pneumoniae* cepa encapsulada A66.1 (sorotipo 3), em diferentes intensidades de acordo com o soro avaliado, sendo que na amostra do soro do grupo controle, que recebeu Alum, também houve deposição em 44,55% das células. Os soros dos animais imunizados com a vacina celular pneumocócica promoveram o aumento da deposição de C3, sendo que os grupos que apresentaram maior deposição foram dos animais imunizados com os lotes F0305 e F2407, com 88,68% e 87,12% respectivamente, provavelmente porque estes foram os soros com maiores níveis de anticorpos, conforme seção 4.9. Estas diferenças apresentadas entre os soros dos diferentes grupos imunizados, provavelmente ocorreram porque este ensaio foi realizado com uma concentração única de soro para todos os grupos e, portanto a concentração de anticorpos não foi corrigida, sugerindo que porcentagens mais baixas de células marcadas poderiam também ter ocorrido devido à menor quantidade de anticorpos.

Também foram avaliados soros dos animais imunizados com amostras do ensaio de estabilidade do produto final descrito em 3.18. O soro do grupo de animais imunizados com as amostras 2 (dialisada) do lote F2407 apresentou porcentagem de células marcadas similar a vacina não tratada. No entanto, as amostras 10 (fervida) e 6 (periodato, proteinase K, fervura) apresentaram menor porcentagem de células marcadas em comparação aos demais grupos avaliados, sendo estas porcentagens mais próximas da apresentada pelo grupo Alum. Provavelmente, neste caso, isto ocorreu porque os anticorpos gerados não reconheceram as proteínas em sua conformação natural, no caso do soro do grupo imunizado com a amostra fervida e, devido à ausência de anticorpos específicos, no caso do grupo imunizado com a amostra tratada com periodato/ proteinase K/ fervura, conforme será discutido em detalhes adiante na seção 4.13.

Figura 43 – Avaliação da deposição de moléculas C3 sobre a superfície de *S. pneumoniae* cepa A66.1, sorotipo 3, na presença de soro anti-WCV dos grupos imunizados com diferentes preparações vacinais.

A suspensão da bactéria viva, cepa A66.1, foi incubada com soro anti-WCV, depois com fonte de complemento de camundongos não imunizados e por fim com anti-C3 conjugado a FITC. Soro dos animais que receberam Alum foi usado como controle negativo e está representado pela área cinza, já os soros anti-WCV estão representados em branco. Os grupos dos animais imunizados estão especificados no topo de cada figura. A porcentagem da população marcada (> 10 unidades de intensidade de fluorescência) foi calculada para cada amostra e está indicada acima de cada pico.

Resultados similares foram obtidos para *S. pneumoniae* cepa encapsulada WU2. Na Figura 44 é possível verificar que a porcentagem de células marcadas para o controle negativo (12,66%) foi menor do que o apresentado para cepa A66.1 (44,55%), sendo que as duas cepas têm cápsula do sorotipo 3. Então, provavelmente, esta diferença ocorreu porque a deposição de moléculas do sistema complemento também depende do background genético da bactéria, como apresentado por Abeyta et al. (2003). Estes autores demonstraram que 2 cepas diferentes (D39 e WU2) quando têm suas cápsulas removidas geneticamente apresentaram diferença de 3,5 vezes para ligação de C3. Isto foi reafirmado no estudo de Hyams et al. (2011), que mostrou que 6 diferentes cepas de sorotipo 6B ou 4 cepas de sorotipo 23F, ou seja, diferentes cepas portando a mesma cápsula exibiram deposição de C3 diferente entre elas. Outra possibilidade para explicar esta diferença seria simplesmente o fato de serem experimentos realizados em dias diferentes,

visto que Goulart et al. (2011) também utilizaram a cepa A66.1 e a incubação com o soro de animais não imunizados apresentou apenas 10,56% de bactérias positivas.

As células incubadas com os soros dos animais imunizados com os lotes F0305 e F2407 apresentaram novamente as maiores porcentagens de células marcadas, 92,57% e 88,03% respectivamente, como mostra a Figura 44, que pode estar relacionado com a maior concentração de anticorpos, como já explicado acima para os ensaios com a cepa A66.1.

Figura 44 – Avaliação da deposição de moléculas C3 sobre a superfície de *S. pneumoniae* cepa WU2, sorotipo 3, na presença de soro anti-WCV dos grupos imunizados com diferentes preparações vacinais.

A suspensão da bactéria viva, cepa WU2, foi incubada com soro anti-WCV, depois com fonte de complemento de camundongos não imunizados e por fim com anti-C3 conjugado a FITC. Soro dos animais que receberam Alum foi usado como controle negativo e está representado pela área cinza, já os soros anti-WCV estão representados em branco. Os grupos dos animais imunizados estão especificados no topo de cada figura. A porcentagem da população marcada (> 10 unidades de intensidade de fluorescência) foi calculada para cada amostra e está indicada acima de cada pico.

Assim como para a cepa A66.1, a bactéria WU2 incubada com o soro do grupo imunizado com a amostra 2 (dialisada) do lote F2407 apresentou porcentagem de células marcadas similar à amostra incubada com o soro do grupo imunizado com o lote F2407 sem tratamento. Isto indica que a diálise não comprometeu a vacina, e por isso induziu a produção de anticorpos de mesma qualidade, capazes de se ligarem a ambas as cepas de maneira similar. Enquanto o soro do grupo

imunizado com a amostra 10 (fervida) do lote F2407 promoveu deposição das moléculas C3 em menor quantidade de células, quase a metade da obtida com o soro do grupo imunizado com a vacina não tratada ou que foi apenas dialisada. Este resultado sugere novamente que o tratamento de fervura compromete a qualidade dos anticorpos gerados, sendo estes provavelmente anticorpos não conformacionais. Além disso, não houve deposição de C3 quando a cepa WU2 foi incubada com o soro do grupo imunizado com a amostra 6 do lote F2407, tratada com periodato/proteinase K/ fervida, sendo a porcentagem de células marcadas similar ao do grupo controle Alum. Este resultado corroborou os resultados apresentados adiante na seção 4.13.

S. pneumoniae cepas de diferentes sorotipos como D39 (sorotipo 2), TIGR4 (sorotipo 4), 245/00 (sorotipo 14), P854 (sorotipo 19F) e P1079 (sorotipo 1) também foram avaliadas quanto à deposição de complemento mediada por anticorpos anti-WCV. Porém a deposição de C3 na superfície dessas cepas apresentou pouca ou nenhuma diferença entre células tratadas com soro do grupo Alum e com soros dos grupos vacinais (dados não mostrados). A cápsula polissacarídica pode inibir a deposição de complemento, fenômeno verificado por diversos autores, como por exemplo, Hyams et al. (2010), que observaram 100% de bactérias marcadas com anti-C3 FITC após incubação com fonte de complemento quando as cápsulas das cepas D39 e TIGR4 de pneumococo foram removidas. Enquanto que, outros autores observaram que pode ocorrer deposição natural de C3, mesmo na ausência de anticorpos específicos, sendo que esta deposição foi variável de acordo com o sorotipo (Melin et al., 2010). Assim como observado por Abeyta et al. (2003), que demonstraram menor deposição inespecífica de complemento em pneumococo portando a cápsula 3 (cepa WU2) do que com a cápsula 2 (cepa D39). No conjunto, essas observações sugerem que a deposição de complemento mediada por anticorpos deveria ser muito superior à deposição que ocorre naturalmente, para que então a diferença entre o grupo controle e o grupo imunizado pudesse ser detectada, uma vez que ambos os grupos foram incubados com a fonte de complemento no ensaio de deposição de C3 apresentado neste trabalho. Esta hipótese está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho em que a diferença entre os grupos foi detectada em bactérias de cápsula 3, em que normalmente apresentam menor deposição inespecífica, porém quando utilizada a bactéria de cápsula 2, devido a maior deposição sem a mediação por anticorpos, não foi possível distinguir o controle dos grupos imunizados. Isto também poderia explicar porque não foi possível distinguir a deposição de C3 nas outras cepas de pneumococo testadas.

Outra possibilidade para a ausência de diferença de deposição de moléculas C3 entre o grupo controle e o grupo de animais imunizados seria o fato de que a PspA tem a capacidade de inibir a deposição de complemento e na presença de anticorpos anti-PspA esta inibição é reduzida (Ren et al., 2004). Normalmente, o soro utilizado em ensaios de deposição de complemento mediado por anticorpos anti-PspA é obtido após 3 doses de imunização com PspA recombinante e apresenta títulos de cerca de 10.000 µg/mL (Goulart et al., 2013). Neste trabalho, o soro anti-WCV obtido após 2 doses de imunização apresentou títulos anti-PspA de 145 µg/mL, e após 1 dose de imunização o título foi de 16 µg/mL de anti-PspA. Portanto, sugere-se que quando usado o soro anti-WCV haveria PspA não ligada a anticorpos em quantidade suficiente para inibir a deposição de C3, mesmo na presença de anticorpos contra outras moléculas do pneumococo. A detecção da deposição de complemento mediada por anti-WCV sobre as bactérias do sorotipo 3 seria uma exceção, pois esta cápsula não é covalentemente ligada a membrana, o que poderia permitir uma maior acessibilidade aos demais antígenos do pneumococo.

4.11 Ensaios de opsonofagocitose

Outra técnica amplamente utilizada para determinação da potência de vacinas, principalmente de vacinas pneumocócicas polissacarídicas, é a avaliação da capacidade de induzir opsonofagocitose mediada por anticorpos. Diferentes cepas pneumocócicas foram utilizadas, portanto foi avaliada a capacidade da vacina celular pneumocócica para induzir a fagocitose de cepas portando diferentes cápsulas. Cada cepa foi testada em três condições diferentes:

- Grupo 1: Soro anti-WCV de animais imunizados com vacina lote F2407 ou soro de animais que receberam Alum + fonte de complemento de camundongos não imunizados + células peritoneais de camundongos não imunizados, representado como AB + C3;
- Grupo 2: Soro anti-WCV ou soro do grupo Alum + células peritoneais na presença de IL-17A comercial, representado como AB + IL-17A;
- Grupo 3: Soro anti-WCV ou soro do grupo Alum + fonte de complemento + células peritoneais na presença de IL-17A comercial, representado como AB + C3 + IL-17A;

Neste trabalho, além do protocolo padronizado por Goulart et al. (2011), que corresponde ao grupo 1 descrito acima, foram avaliados protocolos diferentes nos grupos 2 e 3 também

descritos acima. Nestes grupos, IL-17A foi utilizada para avaliação de seu papel na proteção contra o pneumococo. Foi descrito que IL-17A é capaz de recrutar e ativar neutrófilos (Kolls, Lindén 2004; Kumar, Sharma 2010). Além disso, a presença de IL-17A foi capaz de aumentar a atividade fagocítica de neutrófilos coletados de sangue periférico humano quando incubados com *Streptococcus pneumoniae* na ausência de anticorpos e moléculas do sistema complemento (Lu et al., 2008). Portanto, neste trabalho, foi avaliado o potencial de IL-17A na ativação dos neutrófilos, obtidos do lavado peritoneal de animais não vacinados, para fagocitose de cepas encapsuladas, supondo que a proteção ocorra mediante a opsonização da bactéria por anti-WCV. Os lavados peritoneais obtidos neste trabalho apresentaram em média 60% de monócitos, 30% de neutrófilos e 10% de linfócitos.

A Figura 45 apresenta os números de UFC recuperadas em placas de ágar-sangue, de diferentes cepas de pneumococo utilizadas no ensaio de opsonofagocitose, na presença de complemento (condição do grupo 1). Todas as cepas foram incubadas com o soro proveniente de animais imunizados com o lote F2407. Como controle positivo foi utilizado o soro anti-PspA, utilizado por Goulart et al. (2011), pois sua capacidade de induzir a opsonofagocitose nesse ensaio já estava estabelecida. Como controle negativo, foi utilizado o soro de animais que receberam Alum. Depois, todas as amostras foram incubadas com a fonte de complemento e por fim com as células peritoneais. É possível observar redução de UFC recuperadas, para todas as cepas avaliadas que foram incubadas com o soro anti-WCV e anti-PspA, e esta redução foi estatisticamente diferente quando comparada com as cepas incubadas com soro do controle negativo. Exceto para as cepas A66.1 e WU2, ambas sorotipo 3, a redução de UFC com o soro anti-WCV foi menor que a obtida com o soro anti-PspA. Isto poderia ser explicado pelo fato do soro anti-WCV ser proveniente de animais que receberam uma ou duas doses de imunização, enquanto que anti-PspA foi obtido de animais que receberam três doses. Ou ainda este efeito poderia ter sido ocasionado pelas diferenças entre as cápsulas polissacarídicas, tal como discutido para deposição de complemento em cepas de pneumococo dos sorotipos 2 e 3, no caso cepas D39 e WU2, respectivamente (Abeyta et al., 2003). Alternativamente, o anticorpo anti-PspA pode ser mais eficiente na ativação da opsonofagocitose.

Estes resultados indicam que anti-WCV foi capaz de induzir a deposição de moléculas do sistema complemento, e por consequência a fagocitose, apesar de não terem sido observadas diferenças em comparação com o grupo controle no ensaio realizado por citometria de fluxo

apresentado na seção 4.10, para as cepas que não eram do sorotipo 3. Isto porque no ensaio de opsonofagocitose, na presença apenas de anticorpo e na ausência da fonte do sistema complemento, não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e imunizados (dados não mostrados).

Figura 45 – Avaliação da indução de opsonofagocitose na presença de soro anti-WCV e moléculas do sistema complemento (grupo 1), para diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Cepa e condição utilizada descritas no cabeçalho de cada figura. As barras pequenas representam o desvio padrão de cada média e os asteriscos representam o grau de significância (**P < 0,0001; **P < 0,01; *P < 0,05).

A avaliação do grupo 2, apresentada na Figura 46, mostra que soro anti-WCV, mesmo na ausência da fonte de complemento, induziu a fagocitose após ativação das células fagocitárias com IL-17A adicionada durante a incubação com as células peritoneais. O mesmo foi observado para o soro anti-PspA. A redução de UFC recuperada apresentou diferença estatística significativa para todas as cepas testadas incubadas com o soro anti-WCV e anti-PspA, quando comparada com as cepas incubadas com soro do controle negativo (Figura 46). Além disso, neste grupo 2 a recuperação de UFC observada para o soro anti-WCV e o soro anti-PspA foram comparáveis para a maior parte das cepas.

Deduz-se que ocorreu fagocitose neste ensaio, e não o efeito de degranulação ou tóxico dos neutrófilos, analogamente ao observado por Lu et al. (2008). Estes autores mostraram que neutrófilos quando ativados com IL-17A, seguidos de lavagem com PBS, e então incubados com pneumococo, reduziram o número de bactérias recuperadas. Isto foi diferente do observado quando o pneumococo foi incubado apenas na presença do sobrenadante da lavagem dos neutrófilos ativados, em que não houve redução de UFC, sugerindo que apenas os componentes presentes neste sobrenadante, no caso a IL-17A ou componentes tóxicos da degranulação, não foram suficientes para matar o pneumococo e, portanto o mecanismo para a morte da bactéria seria por fagocitose (Lu et al., 2008).

A concentração de IL-17A escolhida para utilização neste trabalho foi de 3 ng/mL, pois foi um dos valores mais altos obtidos no ensaio de estimulação *in vitro* de células sanguíneas para a produção desta citocina apresentados neste trabalho (Figura 40 e Figura 41). Porém, esta concentração foi muito inferior à utilizada por Lu et al. (2008) que constatarem diferença estatística na redução de UFC apenas em concentrações superiores a 1 µg/mL em relação ao grupo controle, no caso neutrófilos não ativados, em ensaio de dose dependência de fagocitose mediada por IL-17A na ausência de anticorpos. Portanto, os ensaios de opsonofagocitose com IL-17A apresentados neste trabalho sugerem que, talvez, concentrações inferiores desta citocina sejam suficientes para ativar neutrófilos para fagocitose de bactérias opsonizadas por anticorpos na ausência de moléculas do sistema complemento.

Figura 46 – Avaliação da indução de opsonofagocitose na presença de soro anti-WCV e IL-17A (grupo 2), para diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Cepa e condição utilizada descritas no cabeçalho de cada figura. As barras pequenas representam o desvio padrão de cada média e os asteriscos representam o grau de significância (**P < 0,0001; **P < 0,01; *P < 0,05).

O ensaio de opsonofagocitose referente ao grupo 3, apresentado na Figura 47, foi realizado a fim de observar se haveria efeito de potencialização da opsonofagocitose na presença dos dois componentes que, conforme mostrado neste trabalho, ativam as células fagocitárias. É possível observar que ocorreu a redução da UFC recuperada para todas as cepas incubadas com anti-WCV e anti-PspA, assim como ocorreu nos grupos 1 e 2, e esta redução foi estatisticamente diferente em relação ao grupo controle.

No entanto, quando os três grupos foram comparados, observou-se que não ocorreu a potencialização, ou seja, no grupo 3, em que as bactérias foram incubadas com anticorpo e moléculas do sistema complemento e as células peritoneais foram ativadas com IL-17A, a redução de colônias não foi superior àquela apresentada no grupo 1, em que foi realizado na ausência de IL-17A.

Figura 47 – Avaliação da indução de opsonofagocitose na presença de soro anti-WCV e moléculas do sistema complemento e IL-17A (grupo 3), para diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Cepa e condição utilizada descritas no cabeçalho de cada figura. As barras pequenas representam o desvio padrão de cada média e os asteriscos representam o grau de significância (**P < 0,0001; **P < 0,01; *P < 0,05).

Outra observação é que os soros anti-WCV e anti-PspA apresentaram igual redução de colônias recuperadas para as cepas A66.1 e WU2 nos grupos 1 e 2. Também foram observados resultados bastante semelhantes da contagem de colônias para as demais cepas do grupo 2, com exceção da P1079. Por outro lado, os resultados do soro anti-PspA foram melhores, em média 2 vezes maior redução de colônias, para as cepas P854, P1079 e 245/00 no grupo 1, P1079 no grupo 2 e P854 e 245/00 no grupo 3. A maior redução observada com soro anti-PspA poderia ter relação com o número de doses administradas aos animais, tal como discutido anteriormente para o ensaio de deposição de complemento (seção 4.10), pois nos grupos 1 e 3 maior quantidade de anticorpos anti-PspA estariam ligadas a bactéria, o que diminuiria o efeito de inibição de deposição de C3 causada por PspA livre. Isto corrobora o fato que o grupo 2 foi o que apresentou menos diferenças entre os resultados para o soro anti-PspA e anti-WCV, já que neste grupo moléculas do sistema complemento não estão envolvidas no mecanismo de opsonofagocitose.

Os resultados com soro anti-PspA apresentados neste trabalho foram similares aos de Goulart et al. (2011), que desenvolveram a metodologia aqui reproduzida no grupo 1, e que obtiveram redução de colônias de 30 a 40% em relação ao grupo controle. Os resultados de opsonofagocitose utilizando diferentes cepas de pneumococo sugerem diferenças na susceptibilidade das cepas à opsonofagocitose, que podem ter ocorrido por vários fatores como: experimentos realizados em dias diferentes; idade dos animais utilizados para coleta de células; ou pela diferença da cápsula polissacarídica, tal como demonstrado por Melin et al. (2009), que constataram que cepas do sorotipo 19F são mais resistente a opsonofagocitose do que cepas do sorotipo 6B, quando mediada por anticorpos anticápsulas presente no soro de indivíduos imunizados com a vacina polissacarídica 11-valente; ou como seu trabalho seguinte, em que foram identificadas cepas de referência ou de isolados clínicos dos sorotipos 1, 5 e 19F que eram mais resistentes à opsonofagocitose do que cepas dos sorotipos 23F e 6B (Melin et al., 2010). Neste mesmo trabalho os autores sugeriram que sorotipos mais resistentes à deposição inespecífica de complemento requerem maior concentração de anticorpos anticápsula específicos para aumento da opsonofagocitose do pneumococo.

A discordância entre resultados de ensaios de ligação de anticorpo, deposição de complemento e de opsonofagocitose, como apresentados neste trabalho, já foi observada anteriormente na literatura. Como exemplo, Brown e colaboradores (1982) em ensaio para averiguar a capacidade de anticorpos antiparede celular de pneumococo em ativar complemento,

não conseguiram observar a indução de morte por células polimorfonucleares, possivelmente porque neste trabalho tenham sido utilizados anticorpos apenas contra a parede celular.

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho sugerem o seguinte mecanismo de proteção da vacina celular pneumocócica: linfócitos T primados pela vacina entrariam em contato com o patógeno e iniciariam a produção de IL-17A, e com isso poderiam estimular as células fagocitárias circulantes ou recrutá-las para destruição do patógeno por fagocitose, que poderia então ocorrer tanto na presença de anticorpos ligados ao patógeno (conforme resultados do grupo 2), como na presença do patógeno opsonizado por moléculas do sistema complemento, sendo que esta deposição seria mediada pela ligação de anticorpos (conforme resultados do grupo 1), ou apenas por neutrófilos estimulados com IL-17A, tal como mostrado por Lu et al. (2008).

4.12 Ensaios de desafio

Após imunização com uma ou duas doses, os animais foram desafiados com a cepa encapsulada de *Streptococcus pneumoniae* WU2 para averiguar se as vacinas obtidas por meio de diferentes processos de produção seriam capazes de proteger os animais com a mesma taxa de sobrevivência que a vacina controle lote 007/09. O modelo de desafio de morte por sepse após aspiração da bactéria foi escolhido pelo fato da via nasal ser a via de entrada do patógeno em humanos, por isso assemelha-se ao modelo de infecção natural. Além disso, este foi o modelo de infecção padronizado para o controle de qualidade da vacina produzida de acordo com as normas cGMP (Lu et al., 2010b).

Conforme apresentado na Figura 48, todas as vacinas produzidas utilizando diferentes processos fermentativos foram capazes de proteger 100% dos animais imunizados. Os animais que receberam a vacina utilizada como controle positivo, lote 007/09, apresentaram menor taxa de sobrevivência, 80%, mas que ainda foi estatisticamente diferente do grupo controle Alum, que apresentou uma sobrevivência de 20% dos animais ($P = 0,0067$), e similar aos demais grupos que apresentaram sobrevivência de 100%, pois não houve diferença estatística entre eles. O resultado obtido para o lote 007/09 não era esperado, visto que nos ensaios de padronização este lote apresentou 100% de proteção dos animais. Duas hipóteses explicariam o ocorrido: a vacina começaria a perder sua atividade 3 anos após ser produzida, ou alguns animais não teriam recebido a vacina apropriadamente, pois poderia ter ocorrido gotejamento do local da aplicação.

Vale acrescentar que os dois animais pertencentes ao grupo que recebeu o lote 007/09, e que morreram no ensaio de desafio, apresentaram níveis de anticorpos e IL-17A distintos entre eles: um deles apresentou um dos maiores valores (IgG = 53.000 unidades e 2,46 ng/mL de IL-17A) e o outro apresentou um dos valores mais baixos (IgG = 5.000 unidades e 0,35 ng/mL de IL-17A). Estes resultados sugerem que a avaliação de anticorpos ou a dosagem de IL-17A, após estímulo de células *in vitro*, não são ensaios que poderiam ser utilizados como correlatos de proteção para a vacina celular pneumocócica neste modelo de desafio.

Figura 48 – Avaliação da sobrevivência, após desafio intranasal, dos animais imunizados com as vacinas produzidas por diferentes processos fermentativos.

Sobrevivência analisada pelo método de Kaplan-Meier e o teste de log-Rank para comparação das curvas. * P = 0,0067; ** P < 0,0001.

No ensaio seguinte, em que se avaliou a qualidade das vacinas obtidas com o sistema de microfiltração tangencial ou por centrifugação, e das vacinas armazenadas a diferentes temperaturas (-80 e 4°C), quase todas as vacinas protegeram 100% dos animais imunizados. As exceções foram as vacinas F2103, que corresponde ao processo descontínuo simples e coletado com o sistema de microfiltração tangencial, e o lote controle 007/09, que protegeram 90%. Apesar desta menor proteção, todos os grupos apresentaram taxa de sobrevivência estatisticamente diferente do controle negativo Alum, em que não houve sobrevivência ($P <$

0,0001), conforme mostra a Figura 49. Novamente, os animais que morreram, pertencentes aos grupos 007/09 e F2103, apresentaram níveis de IgG e IL-17A muito próximos a média de seu grupo, não justificando portanto a morte dos animais, o que reforça a necessidade de utilização de outro ensaio como correlato de proteção para este modelo de desafio para a vacina celular pneumocócica. Além disso, os animais que apresentaram baixos níveis de IL-17A e não morreram no ensaio de desafio, apresentaram níveis de anticorpos próximos a mil unidades, sugerindo que a presença de anticorpos seria mais importante do que IL-17A para a proteção dos animais neste modelo de desafio, porém não se deve descartar a hipótese de erro operacional no ensaio de avaliação de IL-17A.

Figura 49 – Avaliação da sobrevivência, após desafio intranasal, dos animais imunizados com as vacinas produzidas em diferentes processos fermentativos, com diferentes metodologias de separação celular e armazenadas em diferentes temperaturas.

Sobrevivência analisada pelo método de Kaplan-Meier e o teste de log-Rank para comparação das curvas. * $P < 0,0001$.

4.13 Avaliação da estabilidade do produto final

A avaliação da estabilidade do produto final foi realizada com o lote F2407, obtido pelo processo contínuo com reciclo de células. Para isso, amostras deste lote foram submetidas à ação de agentes químicos e físicos para verificar se a degradação de componentes específicos da

vacina poderia comprometer sua habilidade de induzir a produção de anticorpos e IL-17A, além de proteção contra o desafio por sepsis em animais. Os agentes químicos utilizados foram o periodato de sódio, que foi utilizado pela sua habilidade de fragmentação da parede celular devido à ação oxidativa de hidroxilas vicinais do ácido teicóico (Malley et al., 2006), e a proteinase K, uma serino-protease isolada do fungo *Tritirachium album*, com ampla capacidade de clivagem de proteínas nativas e desnaturadas (Ebeling et al., 1974). Os agentes físicos foram: diálise para remoção dos reagentes utilizados e dos fragmentos resultantes da atividade do periodato e fervura para desnaturação das proteínas.

As amostras obtidas após cada tratamento químico e/ou físico realizado foram submetidas ao SDS-PAGE e posterior coloração com Coomassie ou realização de Western blot. A Figura 50 mostra o gel corado com Coomassie, em que é possível verificar que a diálise não comprometeu a vacina (amostra 2 - dialisada), quando comparada com a amostra 1 em que não houve nenhum tratamento. No entanto, é possível observar, nas amostras 3 e 4, que o tratamento com periodato de sódio comprometeu a integridade das proteínas, pois observou-se um grande arraste no gel, com poucas bandas bem definidas, diferente das amostras 1 e 2. Provavelmente porque o periodato também tem ação oxidativa sobre diferentes aminoácidos (Clamp, Hough, 1965). Para as amostras tratadas com proteinase K (5 a 9), é possível constatar que quase todas as proteínas foram digeridas pela enzima, o que era esperado para este tratamento. Aparentemente, nas amostras 6 e 9 o processo de fervura destruiu as poucas proteínas que restaram, visto que nestas amostras não há praticamente coloração de banda alguma.

Figura 50 – Avaliação de proteínas presentes no lote F2407 da vacina celular pneumocócica após tratamentos físicos e químicos.

No cabeçalho estão apresentados os números que correspondem às amostras que receberam os seguintes tratamentos: 1- lote sem tratamento (44 µg proteína/poço); 2- diálise; 3- diálise e periodato de sódio; 4- diálise, periodato de sódio e outra etapa de diálise; 5- diálise, periodato de sódio, diálise e proteinase K; 6- diálise, periodato de sódio, diálise, proteinase K e fervura; 7- diálise, periodato de sódio, proteinase K; 8- diálise, proteinase K; 9- diálise, proteinase K e fervura; 10- marcador de massa molecular.

As seguintes amostras obtidas após o tratamento de alíquotas do lote F2407 foram utilizadas em ensaios imunológicos: amostra 2, que foi apenas dialisada; a amostra 6, que passou por todos os tratamentos, no caso diálise, periodato de sódio, nova diálise, proteinase K e fervura; e amostra 10, que foi dialisada e depois submetida à fervura. Estas 3 amostras foram aplicadas ao SDS-PAGE e depois as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi corada com Ponceau, para posterior digitalização da imagem, que está apresentada ao lado direito da Figura 51. Depois que a membrana foi descorada, ela foi utilizada para o Western blot, para o qual foram utilizados anticorpos anti-WCV, cuja imagem está apresentada no lado esquerdo da Figura 51. É possível confirmar que a amostra dialisada (caneletas 2) não apresentou diferenças se comparada com a amostra sem tratamento (caneletas 1). Já a amostra fervida apresentou um arraste na coloração com Ponceau, e bandas bem definidas no Western blot (caneletas 3), porém algumas proteínas estavam em menor quantidade quando comparadas com bandas das amostras das caneletas 1 e 2. A amostra que passou por todos os tratamentos não apresentou bandas nem mesmo no Western blot que tem maior sensibilidade do que a coloração

com Ponceau (caneletas 4). Isto indica que a proteinase K degradou todas as proteínas que compunham a vacina.

Figura 51 – Avaliação de proteínas presentes no lote F2407 da vacina celular pneumocócica após tratamentos físicos e químicos que foram utilizadas nos ensaios imunológicos

Lado esquerdo da figura representa o Western blot utilizando soro anti-WCV, lado direito representa a coloração da membrana com Ponceau. No cabeçalho estão apresentados os números que correspondem às amostras que receberam os seguintes tratamentos: 1- lote sem tratamento (50 µg proteína/poço); 2- diálise (amostra 2); 3- diálise e fervura (amostra 10); 4- diálise, periodato de sódio, diálise, proteinase K e fervura (amostra 6); 5- marcador de massa molecular.

Os ensaios imunológicos realizados com as amostras apresentadas na Figura 51 consistiram na imunização de animais com uma dose, avaliação de anticorpos produzidos e a indução de IL-17A, e por fim o ensaio de desafio. Todos os ensaios foram realizados da mesma maneira como os realizados para todas as vacinas produzidas neste trabalho, descrito nas seções 3.10 a 3.13 e 3.17.

A Figura 52A apresenta os níveis de anticorpos obtidos para cada grupo de animais imunizados. O grupo imunizado com a amostra dialisada do lote F2407 apresentou maiores níveis de anticorpos do que os grupos que receberam Alum ou a amostra tratada com periodato, proteinase K e fervida ($P < 0,0001$) e também do que o grupo imunizado com a amostra dialisada e fervida do lote F2407 ($P = 0,0433$). O grupo imunizado com a amostra dialisada e fervida do lote F2407 também apresentou níveis de anticorpos estatisticamente superiores em relação aos grupos que receberam Alum e amostra tratada com periodato, proteinase K e fervida

($P < 0,0001$). Estes resultados indicam que apenas a desnaturação das proteínas causada pela fervura da amostra ocasionou a indução de níveis de anticorpos relativamente reduzidos em comparação à amostra dialisada. Isto sugere menor quantidade de anticorpos conformacionais produzidos por este grupo de animais, visto que a vacina que eles receberam estava desnaturada e que as placas do ELISA para dosagem de IgG foram sensibilizadas com as proteínas em sua conformação nativa, já que foi utilizado o lote 007/09 da vacina celular como antígeno. Outra observação deste ensaio é que os tratamentos com periodato e proteinase K comprometeram totalmente a qualidade da vacina, pois os níveis de anticorpos obtidos foram similares ao grupo que recebeu o controle negativo Alum.

No ensaio de indução da produção de IL-17A, os grupos imunizados com as amostras dialisada e dialisada/fervida apresentaram níveis similares, sem diferença estatística, conforme apresentado na Figura 52B, o que foi diferente do observado para a produção de anticorpos. Estes dois grupos apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com o grupo que recebeu Alum ($P = 0,0002$). No entanto, tal como verificado para os anticorpos, o grupo imunizado com amostra tratada com periodato, proteinase K e fervida apresentou baixos níveis de IL-17A, que foram estatisticamente diferentes dos demais grupos vacinais ($P = 0,0004$) e do grupo Alum ($P = 0,0039$). Isto indica que a oxidação dos ácidos teicóico e lipoteicóico e a digestão das proteínas, dado os tratamentos com periodato de sódio e proteinase K, comprometeram a qualidade da vacina, de maneira que apenas a indução de IL-17A foi observada, porém em baixos níveis, mas que foram estatisticamente diferentes dos apresentados pelo grupo Alum. Estas observações sugerem que a amostra tratada com periodato de sódio e proteinase K ainda foi capaz de induzir resposta celular, porém em níveis mais baixos, talvez devido à presença residual de motivos capazes de estimular linfócitos Th17, mas perdeu a capacidade de induzir resposta humoral, supostamente porque os peptídeos gerados deixaram de ser imunogênicos. Os níveis de IL-17A considerados como correlatos de proteção em ensaios de desafio são ≥ 250 pg/mL (Moffitt et al., 2012), no entanto estes valores foram preditos para ensaios de desafio por colonização de animais imunizados, portanto diferentes dos ensaios de sepsis por aspiração utilizados neste trabalho.

Figura 52 – Avaliação da estabilidade da vacina celular pneumocócica, lote F2407, a agentes químicos e físicos.

Alum representa os animais que receberam o hidróxido de alumínio; F2407 dialysada representa os que receberam a amostra dialysada (amostra 2); F2407 fervida representa os que receberam a amostra dialysada e depois fervida (amostra 10); F2407 periodato e proteinase K os que receberam a amostra dialysada, tratada com periodato de sódio, dialysada novamente, depois tratada com proteinase K e por fim fervida (amostra 6). Em A, níveis de anticorpos são apresentados e comparados com o controle negativo Alum ou entre os grupos indicados (** $P < 0,0001$; * $P = 0,0433$); em B, níveis de IL-17A obtidos após o estímulo e comparados com o controle negativo Alum ou entre os grupos indicados (*** $P = 0,0002$; ** $P = 0,0004$; * $P = 0,0039$); em C, resultado do ensaio de desafio, porcentagens de sobrevivência dos animais e diferença estatística (* $P = 0,0004$) em relação ao grupo Alum.

Na Figura 52C está representada a porcentagem de sobrevivência dos animais imunizados que também foram desafiados pela via intranasal. Os animais dos grupos imunizados com as amostras dialysada e dialysada/ fervida do lote F2407 apresentaram 100% de sobrevivência. Já no grupo imunizado com a amostra tratada com periodato de sódio/ proteinase K/ fervura não foi observado nenhum animal sobrevivente durante o período do experimento, portanto esta amostra de vacina não protegeu os animais. O grupo Alum apresentou 20% de sobrevivência, sendo esta porcentagem estatisticamente diferente dos grupos que receberam a amostra dialysada e dialysada/fervida ($P = 0,0004$), mas não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo que recebeu a amostra tratada com periodato/ proteinase K e fervura. O sangue dos dois animais foi plaqueado em placas TSA-ágar-sangue, e constatou-se a ausência de bacteremia, portanto estes animais do grupo Alum não estavam doentes.

Conforme apresentado, diferenças na produção de anticorpos (Figura 52A) entre os grupos que receberam a amostra dialysada e a amostra fervida da vacina lote F2407, não promoveram diferenças no ensaio de desafio, já que todos os animais imunizados com a vacina

fervida sobreviveram. Isto reforça a ideia de que a proteção neste modelo de desafio ocorreu mesmo na presença de menor quantidade de anticorpos, além de não serem anticorpos contra motivos conservados da proteína, já que as proteínas da vacina administrada estavam provavelmente desnaturadas. Esta hipótese é corroborada pelos resultados de deposição de moléculas do sistema complemento, em que menores porcentagens de células marcadas foram obtidas quando o soro de animais imunizados com a vacina fervida foi utilizado (seção 4.10). Portanto, sugere-se que outro mecanismo, como a produção de IL-17A, possa ter favorecido a proteção.

Os resultados apresentados neste ensaio de desafio indicaram que a presença tanto das proteínas inteiras como da parede celular desta bactéria foi necessária para induzir uma resposta imune protetora para este modelo de desafio, pois a vacina tratada com periodato de sódio e proteinase K não protegeu os animais. Mas a conformação natural das proteínas presente na vacina não foi necessária, já que a imunização com a amostra fervida protegeu os animais neste modelo de desafio. Poder-se-ia sugerir, com base nas observações de Malley et al. (2006), que o tratamento apenas com periodato de sódio já seria capaz de degradar a vacina a ponto de comprometer sua eficácia, mesmo se as proteínas estivessem íntegras na amostra. Os autores demonstraram que animais imunizados apenas com a parede celular de pneumococo pela via intranasal apresentaram redução do número de colônias desta bactéria em ensaios de desafio de colonização, porém quando os polissacarídeos dos ácidos teicóico e lipoteicóico desta amostra foram oxidados com periodato de sódio este efeito foi perdido. Segundo Malley e colaboradores (2006), o peptídeo glicano não é oxidado por periodato de sódio, portanto o peptídeo glicano sozinho não foi capaz de reduzir a colonização. Além disso, no ensaio em que removeram o peptídeo glicano e outras possíveis proteínas com ácido tricloroacético, a redução da colonização foi similar ao grupo controle em que a amostra não foi tratada, indicando que proteínas da parede e peptídeo glicano não eram importantes no modelo de desafio por colonização e ressaltando a importância dos ácidos teicóico e lipoteicóico. Porém, os estudos de Moffitt et al. (2012) mostraram que a imunização via intranasal com apenas 3 proteínas que compõem o sobrenadante da vacina celular pneumocócica levou à proteção dos animais com a redução de colonização, assim pode-se dizer que as proteínas presentes na vacina também desempenham um papel importante na proteção contra a colonização.

Por fim, os ensaios realizados neste trabalho indicaram que a vacina é robusta, mas que, como qualquer produto biológico, se sua composição for comprometida, sua qualidade também será. Isto enfatiza a ideia de que a vacina deve ser produzida com cuidados apropriados para que não comprometa sua composição, além de evidenciar que a metodologia dos ensaios imunológicos aplicada neste trabalho foi capaz de detectar a perda da qualidade da vacina.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados sobre os processos realizados para a produção da vacina celular pneumocócica neste trabalho, pode-se concluir que:

1. Dentre as três estratégias de cultivo avaliadas, o processo contínuo com reciclo de células, realizado conforme a condição 4, apresentou maior DO, em média 30, e maior massa seca de *Streptococcus pneumoniae* cepa RM200, em média 11,3 g/L, portanto foi melhor que os processos descontínuo e descontínuo alimentado.
2. Os processos descontínuo e descontínuo alimentado apresentaram DO máximas diferentes, 10 e 14 respectivamente, porém massas secas iguais, em média 4,2 g/L. É possível que existam diferenças de tamanho e/ou complexidade entre as bactérias cultivadas nos dois processos, conforme sugerido nos ensaios de citometria de fluxo, diferenças que poderiam estar relacionadas à maior concentração de soytone no meio de cultura do processo descontínuo.
3. O processo descontínuo, quando conduzido até o início da fase estacionária de crescimento, apresentou maior DO, massa seca, conteúdo proteico total do produto final e por consequência maior número hipotético de doses, quando comparado ao processo previamente padronizado em 60 L para a produção da vacina celular pneumocócica.
4. A bactéria cultivada nos diferentes processos fermentativos realizados apresentou $\mu_{\text{máx}}$ similar, em média $1,20 \text{ h}^{-1}$, pois a velocidade específica máxima de crescimento foi obtida na fase de batelada de todos os cultivos, portanto a bactéria se apresentava nas mesmas condições de crescimento neste momento, independente do processo realizado. Portanto, a concentração maior de soytone usada no meio de cultura do processo descontínuo não repercutiu em diferenças na velocidade específica máxima de crescimento.
5. O crescimento da bactéria nos processos descontínuo alimentado e contínuo com reciclo de células cessou, provavelmente, devido às concentrações inibitórias dos metabólitos presente no reator. Neste trabalho, estimou-se que a concentração inibitória de lactato para esta bactéria seria de 21 g/L.
6. No processo contínuo com reciclo de células a bactéria não continuou a crescer, possivelmente porque o efeito de polarização da membrana de microfiltração tangencial impediu maior remoção dos metabólitos inibitórios do crescimento. Esta hipótese é

fortalecida pelo alto consumo de NaOH para o controle de pH nestes cultivos, pois em altas taxas de diluição seria esperado menor consumo de NaOH, uma vez que os metabólitos estão sendo constantemente removidos.

7. O fator de conversão de glicose em biomassa foi semelhante em todos os processos fermentativos realizados, em média o valor de $Y_{X/S}$ foi $0,15 \text{ g massa seca/g glicose}$.
8. O processo contínuo com reciclo de células apresentou maior $Y_{lac/S}$, $0,97 \text{ g lactato/g glicose}$, e maior $Y_{lac/X}$, $6,05 \text{ g lactato/g massa seca}$, indicando que esta estratégia de cultivo levou a bactéria a produzir mais lactato por grama de glicose consumida e mais lactato por grama de células do que os cultivos descontínuo e descontínuo alimentado. Diferentemente, o $Y_{acet/S}$ indicou que a maior produção de acetato por grama de glicose consumida ocorreu quando a bactéria foi cultivada segundo a metodologia do processo descontínuo, com valor médio de $0,41 \text{ g acetato/g glicose}$.
9. A maior produtividade volumétrica foi obtida no processo contínuo com reciclo de células, $P_X = 1,23 \text{ g massa seca/L.h}$, que foi 1,4 vezes maior que a do processo descontínuo e 1,6 vezes maior do que a do descontínuo alimentado.
10. O produto final, após a inativação com BPL, apresentou aspecto de grumos quando produzido utilizando a metodologia de centrifugação para a separação celular e lavagem das células. Portanto, sugere-se que este procedimento não seja utilizado na produção da vacina celular pneumocócica.
11. O produto final apresentou diferenças nas quantidades de glicose, acetato e lactato, provavelmente devido a diferenças de DO entre os lotes, ou seja, diferentes concentrações de bactéria por mL, já que existe baixa correlação entre DO e UFC/mL para as suspensões celulares de alta densidade. Isto indica a necessidade de desenvolver novos métodos para determinação rápida da quantidade de células vivas presentes antes da inativação, sendo a medida de DO pouco precisa para esta finalidade.
12. O processo contínuo com reciclo de células condição 4 levaria à produção do maior número hipotético de doses, 338 mil doses, e ao maior número de doses produzidas por ano, 14,2 milhões.
13. Quando avaliados apenas os 3 principais reagentes utilizados no meio de cultura, o processo descontínuo com células cultivadas até DO máxima apresentou o menor custo para produção de 1.000 doses de vacina, cerca de 0,85 dólares americanos, enquanto que

o processo contínuo com reciclo de células condição 4 custaria 1,38. Porém, os processos descontínuos precisariam de no mínimo 3 vezes mais tempo para produzir por ano o mesmo número de doses que o processo contínuo com reciclo de células, ocasionando um maior custo real dos descontínuos, devido ao gasto com o maior número etapas prévias de preparo, esterilização e sanitização e etapas de limpeza posteriores ao cultivo.

14. Portanto, com base no conjunto de resultados obtidos, justifica-se o melhoramento das condições do processo contínuo com reciclo de células para obter maior produção de biomassa. Sendo esta estratégia a melhor a ser adotada para a futura produção comercial da vacina celular pneumocócica.

Com base nos resultados apresentados sobre os ensaios imunológicos utilizando as vacinas produzidas em diferentes condições, pode-se concluir que:

1. Os diferentes lotes da vacina celular pneumocócica produzidos neste trabalho foram igualmente capazes de estimular o sistema imune de camundongos a produzir anticorpos anti-WCV e IL-17A, independentemente da estratégia de cultivo empregada, da metodologia de separação celular e da temperatura de armazenamento. Estes resultados, de maneira geral, também foram similares aos do lote controle 007/09 produzido em 60 L em condições cGMP.
2. Todos os lotes apresentaram o mesmo perfil de proteínas sintetizadas pela bactéria, independente da condição de cultivo realizada, quando avaliado por Western-blot utilizando anticorpos contra diferentes proteínas.
3. Anticorpos anti-WCV foram capazes de se ligar a diferentes cepas de pneumococo, independente da presença da cápsula polissacarídica e do sorotipo, sugerindo que os anticorpos foram capazes de acessar antígenos camuflados pela cápsula.
4. Anticorpos anti-WCV foram capazes de induzir a deposição de moléculas do sistema complemento em cepas de pneumococo sorotipo 3.
5. Anticorpos anti-WCV foram capazes de induzir a opsonofagocitose de diferentes cepas de pneumococo utilizando células peritoneais de camundongos. Esta reação também foi observada na ausência de moléculas do sistema complemento, mas na presença de IL-17A, sugerindo o papel desta citocina como estimuladora de fagócitos na proteção contra o pneumococo.

6. Os diferentes lotes da vacina celular pneumocócica produzidos neste trabalho foram capazes de proteger camundongos em ensaio de desafio empregando o modelo de sepse por aspiração.
7. Os ensaios de desafio sugerem que ainda é necessário avançar na busca de um correlato de proteção mais efetivo do que a avaliação de anticorpos ou a produção de IL-17A, pois os animais que morreram dos grupos imunizados apresentaram níveis de anticorpos e IL-17A similares aos de outros animais que sobreviveram no mesmo ensaio de desafio.
8. Os resultados indicam que o processo contínuo com reciclo de células, que atingiu a maior concentração de biomassa, poderia ser utilizado para a produção da vacina celular pneumocócica, a qual poderia ser armazenada a 4 °C sem comprometimento de sua qualidade.
9. Os ensaios de estabilidade da vacina a agentes químicos e físicos demonstraram que o modelo de desafio utilizado neste trabalho foi capaz de detectar grandes alterações na composição da vacina, como observado quando a vacina foi tratada com periodato e proteinase K. No entanto, provavelmente esse modelo não seria capaz de detectar pequenas alterações na qualidade da vacina, uma vez que a vacina fervida protegeu os animais imunizados a despeito de ter induzido menor nível de anticorpos nos animais imunizados e menor deposição de C3 no ensaio de deposição de complemento. Da mesma maneira, pequenas diferenças na qualidade das vacinas decorrentes de modificações no processo de produção poderiam não ser detectadas pelo ensaio de desafio pelo modelo de sepse por aspiração.

Em resumo, pode-se concluir que a melhor estratégia de cultivo foi a do processo contínuo com reciclo de células, pois foi a que levou à obtenção de maior concentração de massa celular e também a mais econômica, quando comparada aos processos descontínuos e ao processo previamente padronizado em 60 L. Os resultados imunológicos mostraram que a qualidade da vacina não foi comprometida pelo tipo de cultivo realizado, portanto o processo com reciclo de células poderia ser usado para a produção em larga escala da vacina celular pneumocócica.

REFERÊNCIAS*

- Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2003;71(1):218–25.
- Advisory Committee to Vaccines and Related Biological Products – Transmissible Spongiform Encephalopathies. 27 de Julho de 2000.
- Afonso ET, Minamisava R, Bierrenbach AL, Escalante JJC, Alencar AP, Domingues CM, Morais-Neto OL, Toscano CM, Andrade AL. Effect of 10-Valent Pneumococcal Vaccine on Pneumonia among Children, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(4):589-97.
- Aguirre-Ezkauriatza EJ, Aguilar-Yáñez JM, Ramírez-Medrano A, Alvarez MM. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology*. 2010;101:2837–44.
- Alderson MR, Maisonneuve J, Newhouse LC, Boslego JW. PATH pneumococcal vaccine project. *Pediatric Health*. 2010;4(5):471–8.
- Allman R, Hann AC, Phillips AP, Martin KL, Lloyd D. Growth of *Azotobacter uinelandii* with correlation of coulter cell size, flow cytometric parameters and ultrastructure. *Cytometry*. 1990; 11:822-31.
- AlonsoDeVelasco E, Verheul AFM, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiological Reviews*. 1995;59(4):591–03.
- Amin M, Flowers TH. Evaluation of Kjeldahl digestion method. *Journal of Research (Science)*. 2004;15(2):159-79.
- AnaBio. Versão 1.2. Brasil: DEQ – UFSCar. Software.
- Andrade AL, Ternes YM, Vieira MA, Moreira WG, Lamaro-Cardoso J, Kipnis A, Cardoso MR, Brandileone MC, Moura I, Pimenta FC, da Gloria Carvalho M, Saraiva FO, Toscano CM, Minamisava R. Direct effect of 10-valent conjugate pneumococcal vaccination on pneumococcal carriage in children Brazil. *Plos One*. 2014;9(6):1-8.
- Bai R, Leow HF. Microfiltration of activated sludge wastewater—the effect of system operation parameters. *Separation and Purification Technology*. 2002;29:189–98.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Basset A, Thompson CM, Hollingshead SK, Briles DE, Ades EW, Lipsitch M, Malley R. Antibody-independent, CD4⁺ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. *Infection and Immunity*. 2007;75(11):5460–64.

Bauer R, Katsikis N, Varga S, Hekmat D. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2005;5:37–43.

Becton, Dickinson and Company. BD Bionutrients technical manual: Advanced bioprocessing. 3rd ed. revised. EUA; 2006. 67 p.

Belfort G, Davis RH, Zydney AL. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. Review. *Journal of Membrane Science*. 1994;96:1-58.

Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. 2006;152:295–303.

Berry AM, Alexander JE, Mitchell TJ, Andrew PW, Hansman D, Paton JC. Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 1995;63(5):1969-74.

Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein. *Indian J Med Res*. 2011;133(2):179–87.

Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C, Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010;375:1969–87.

Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:144–54.

Borzani W. Fermentação semicontínua. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2001. Vol. 2, cap. 11, p. 219-22.

Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, Ferguson LM, Nahm MH, Nabors GS. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis*. 2000;182:1694-701.

Briles DE, Novak L, Hotomi M, van Ginkel FW, King J. Nasal Colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. *Infection and Immunity*. 2005;73(10):6945–51.

Briles DE, Tart RC, Swiatlo E, Dillard JP, Smith P, Benton KA, Ralph BA, Brooks-Walter A, Crain MJ, Hollingshead SK, McDaniel LS. Pneumococcal diversity: considerations for new

vaccine strategies with emphasis on Pneumococcal Surface Protein A (PspA). *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(4):645–57.

Brown EJ, Hosea SW, Hammer CH, Burch CG. A quantitative analysis of the interactions of antipneumococcal antibody and complement in experimental pneumococcal bacteremia. *J. Clin. Invest.* 1982;69:85-98.

Burton RL, Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006;13(9):1004-9.

Calix JJ, Dagan R, Pelton 4 SI, Porat N, Nahm 4 and MH. Differential occurrence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 11E between asymptomatic carriage and invasive pneumococcal disease isolates reflects a unique model of pathogen microevolution. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54(6):794–9.

Callewaert R, De Vuyst L. Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(2):606–13.

Campos IB, Darrieux M, Ferreira DM, Miyaji EN, Silva DA, Arêas APM, Aires KA, Leite LCC, Ho PL, Oliveira MLS. Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Microbes and Infection*. 2008;10(5): 481-8.

Canvin JR, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae* produces a second haemolysin that is distinct from pneumolysin. *Microbial Pathogenesis*. 1997; 22:129–32.

Carvalho JCM, Sato S. Fermentação descontínua. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2001a. Vol. 2, cap. 9, p. 193-204.

Carvalho JCM, Sato S. Fermentação descontínua alimentada. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blucher; 2001b. Vol. 2, cap. 10, p. 205-18.

Carvalho SM, Kuipers OP, Neves AR. Environmental and nutritional factors that affect growth and metabolism of the pneumococcal serotype 2 strain D39 and its nonencapsulated derivative strain R6. *Plos One*. 2013;8(3):1-15.

Chandler LJ, Reisner BS, Woods GL, Jafri AK. Comparison of four methods for identifying *Streptococcus pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000;37:285–7.

Chang HN, Jung K, Choi J, Lee JC, Woo HC. Multi-stage continuous high cell density culture systems: A review. *Biotechnology Advances*. 2014;32:514–25.

Chang HN, Yoo IK, Kim BS. High density cell culture by membrane-based cell recycle. *Biotech. Adv.* 1994;12:467-87.

Chapuy-regaud S, Duthoit F, Malfroy-Mastrorillo L, Gourdon P, Lindley ND, Trombe MC. Competence regulation by oxygen availability and by Nox is not related to specific adjustment of central metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(9):2957–62.

Charpentier E, Novak R, Tuomanen E. Regulation of growth inhibition at high temperature, autolysis, transformation and adherence in *Streptococcus pneumoniae* by ClpC. *Molecular Microbiology*. 2000;37(4):717-26.

Chen JC, Li Q, Elimelech M. In situ monitoring techniques for concentration polarization and fouling phenomena in membrane filtration. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004;107:83–108.

Chien YW, Klugman KP, Morens DM. Efficacy of whole-cell killed bacterial vaccines in preventing pneumonia and death during the 1918 Influenza pandemic. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(11):1639–48.

Chioccioli M, Hankamer B, Ross IL. Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. *Plos One*. 2014;9(5):1-12.

Clamp JR, Hough L. The periodate oxidation of amino acids with reference to studies on glycoproteins. *Biochem. J.* 1965; 94:17-24.

Class VP. Versão 6.14 SP2. Japão: Shimadzu. Software

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda, MD, USA: U.S. National Library of Medicine from National Institutes of Health (NIH); 2014a [update 2014 May 6; cited 2014 Jun 07]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01537185>.

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda, MD, USA: U.S. National Library of Medicine from National Institutes of Health (NIH); 2014b [cited 2014 Jul 30]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=streptococcus+pneumoniae+protein+vaccine&recr=&rslt=&type=&cond=&intr=&titles=&outc=&spons=&lead=&id=&state1=&cntry1=&state2=&cntry2=&state3=&cntry3=&locn=&gndr=&phase=2&rcv_s=&rcv_e=&lup_s=&lup_e=.

Croucher NJ, Chewapreecha C, Hanage WP, Harris SR, McGee L, van der Linden M, Song JH, Ko KS, de Lencastre H, Turner C, Yang F, Sá-Leão R, Beall B, Klugman KP, Parkhill J, Turner P, Bentley SD. Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. *Genome Biol. Evol.* 2014;6(7):1589–602.

Cundell DR, Weiser JN, Shen J, Young A, Tuomanen EI. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 1995;63(3):757–61.

Darrieux M, Goulart C, Briles D, Leite LCC. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. *Crit Rev Microbiol*, Early Online. 2013:1–11.

De Vuyst L, Vandamme EJ. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*. 1992;138:571-8.

Denapaite D, Brückner R, Hakenbeck R, Vollmer W. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microbial Drug Resistance*. 2012;18(3):344-58.

Dias WD, Leite LCC, Horton DSPQ, Sakauchi MA, Kubrusly FS, Furuyama N, Nascimento IP, Quintilio W, Higashi HG, Raw I. New approaches in pertussis vaccines for developing countries. In: Méndez-Vilas A. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. 1. ed. Badajóz: Formatex; 2007:668-72.

Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;48:385–407

Ding S, Tan T. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*. 2006;41:1451–4.

Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem*. 1974;47:91-7.

Facciotti MCR. Fermentação contínua. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2001. Vol. 2, cap. 12, p. 223-46.

FDA - Department of health & Human Services - USA, letter to manufacturers of biological products. 19 de Abril de 2000.

Fernández M, Zúñiga M. Amino acid catabolic pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 2006;32:155–83.

FlowJo. Versão 8.7.3. EUA: Tree Star Inc. Software

Franco CM, Andrade AL, Andrade JG, Almeida e Silva S, Oliveira CR, Pimenta FC, Lamaro-Cardoso J, Brandão AP, Almeida SC, Calix JJ, Nahm MH, de Cunto Brandileone MC. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(1):77-9.

Fuhrer T, Fischer E, Sauer U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(5):1581–90.

GE Healthcare. Operating handbook: hollow fiber cartridges for membrane separations; 18-1165-30 AB. Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido; 2004. 28p.

Gogola VMR. Cultivo contínuo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14: metabolismo e cinética de produção de polissacarídeo capsular. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto Butantan/IPT/USP, Universidade de São Paulo; 2011.

Gogola-Kolling VMR, Zanardo RT, Carmo TS, Zampoli ND, Figueiredo DB, Gonçalves VM. Improved capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 using continuous cultivation. *Biochem Eng J.* 2014;91:16–22.

Gonçalves VM, Dias WO, Campos IB, Liberman C, Sbrogio-Almeida ME, Silva EP, Cardoso Jr. CP, Alderson M, Robertson G, Maisonneuve JF, Tate A, Anderson P, Malley M, Fratelli F, Leite LCC. Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability. *Vaccine.* 2014; 32:1113–20.

Gonçalves VM, Zangirolami TC, Giordano RLC, Raw I, Tanizaki MM, Giordano RC. Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59:713–7.

Goulart C, da Silva TR, Rodriguez D, Politano WR, Leite LCC, Darrieux M. Characterization of protective immune responses induced by pneumococcal surface protein A in fusion with pneumolysin derivatives. *Plos One.* 2013;8(3):1-12.

Goulart C, Darrieux M, Rodriguez D, Pimenta FC, Brandileone MCC, Andrade ALSS, Leite LCC. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. *Vaccine.* 2011; 29: 1634–42.

GraphPad Prism. Versão 5.03. EUA: GraphPad Software, Inc. Software.

Green BA, Zhang Y, Masi AW, Barniak V, Wetherell M, Smith RP, Reddy MS, Zhu D. PspA, a surface-exposed protein of *Streptococcus pneumoniae*, elicits cross-reactive antibodies that reduce colonization in a murine intranasal immunization and challenge model. *Infection and Immunity.* 2005;73(2):981–9.

Hakenbeck R, Madhour A, Denapaite D, Brückner R. Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33:572–86.

Härtel T, Eylert E, Schulz C, Petruschka L, Gierok P, Grubmüller S, Lalk M, Eisenreich W, Hammerschmidt S. Characterization of central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling. *The Journal of Biological Chemistry (JBC).* 2012;287(6):4260–74.

Hiss H. Cinética de processos fermentativos. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2001. Vol. 2, cap. 6, p. 93-122.

Hoeprich, PD. Carbon-14 labeling of *Diplococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 1955;69:682-8.

Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;26:87–107.

Holst O, Hansson L, Berg AC, Mattiasson B. Continuous culture with complete cell recycle to obtain high cell densities in product inhibited cultures; cultivation of *Streptococcus lactis* for production of superoxide dismutase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1985;23:10-4.

Hoskins J, Alborn Jr WE, Arnold J, Blaszcak LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass JS, Khoja H, Kraft AR, Lagace RE, LeBlanc DJ, Lee LN, Lefkowitz EJ, Lu J, Matsushima P, McAhren SM, McHenney M, McLeaster K, Mundy CW, Nicas TI, Norris FH, O’Gara M, Peery RB, Robertson GT, Rockey P, Sun PM, Winkler ME, Yang Y, Young-Bellido M, Zhao G, Zook CA, Baltz RH, Jaskunas R, Rosteck Jr PR, Skatrud PL, Glass JI. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(19):5709–17.

Hoskisson PA, Hobbs G. Continuous culture – making a comeback? *Microbiology*. 2005;151:3153–9.

Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and Immunity*. 2010;78(2):704–15.

Hyams C, Opel S, Hanage W, Yuste J, Bax K, Henriques-Normark B, Spratt BG, Brown JS. Effects of *Streptococcus pneumoniae* strain background on complement resistance. *Plos One*. 2011;6(10):1-10.

Ienczak JL, Schmidell W, Aragão GMF. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013;40:275–86.

John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74:524–34.

Julià O, Vidal-Mas J, Panikov NS, Vives-Rego J. Skew-Laplace and cell-size distribution in microbial axenic cultures: statistical assessment and biological interpretation. *International Journal of Microbiology*. 2010, Article ID 191585:1-10.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6:288-301.

Kaijalainen T, Rintamaki S, Herva E, Leinonen M. Evaluation of gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Microbiological Methods*. 2002;51:111–8.

Kim JO, Weiser JN. Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. The Journal of Infectious Diseases. 1998;177:368–77.

Kleman GL, Strohl WR. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. Current Opinion in Biotechnology. 1994;5:180-6.

Koch AL, Robertson BR, Button DK. Deduction of the cell volume and mass from forward scatter intensity of bacteria analyzed by flow cytometry. Journal of Microbiological Methods. 1996;27:49-61.

Kolling D, Sari RS, Liberman C, Leite LCC, Pradella JGC, Gonçalves VM. Melhoria do processo produtivo da vacina celular inativada de *Streptococcus pneumoniae* acapsulado. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos; 2009; Natal – RN; Sinaferm; nº. do trabalho: 643

Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity. 2004;21:467-76.

Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. International Immunopharmacology. 2010;(10):1325–34.

Lavergne-Mazeau F, Maftah A, Cenatiempo Y, Julien R. Linear correlation between bacterial overexpression of recombinant peptides and cell light scatter. Appl. Environ. Microbiol. 1996;62(8):3042–6.

Leal MM, Pereira DSG, Jessouroun E, Couto MAPG, Pereira N. Investigation of cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. Electronic Journal of Biotechnology. 2011;14(5):1-7.

Leroy F, De Vuyst L. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 2001;67(10):4407-13.

Liberman C, Kolling D, Sari RS, Takagi M, Cabrera-Crespo J, Sbrogio Almeida ME, Pradella JGC, Leite LCC, Gonçalves VM. Use of soy peptones for *Streptococcus pneumoniae* cultivation for vaccine production. In: Maxwell JE, editor. Soybeans: Cultivation, Uses and Nutrition. Nova York. Nova Science Publishers Inc.; 2011. Cap. 17, p. 415-26.

Liberman C, Takagi M, Cabrera-Crespo J, Sbrogio-Almeida ME, Dias WO, Leite LCC, Gonçalves VM. Pneumococcal whole-cell vaccine: optimization of cell growth of unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* in bioreactor using animal-free medium. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008;35:1441–5.

Ling LS, Mohamad R, Rahim RA, Wan HY, Arif AB. Improved production of live cells of *Lactobacillus rhamnosus* by continuous cultivation using glucose-yeast extract medium. Journal of Microbiology. 2006; 44,(4):439-46.

Lorian V, Popoola B. Pneumococci producing beta hemolysis on agar. *Applied Microbiology*. 1972;24(1):44-7.

Lorian V, Waluschka A, Popoola B. Pneumococcal beta hemolysin produced under the effect of antibiotics. *Applied Microbiology*. 1973;25(2):290-4.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-75.

Lu YJ, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls JK, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, Thompson CM, Harney KF, Anderson PW, Lipsitch M, Malley R. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PloS Pathogens*. 2008;4(9):1-11.

Lu YJ, Yadav P, Clements JD, Forte S, Srivastava A, Thompson CM, Seid R, Look J, Alderson M, Tate A, Maisonneuve JF, Robertson G, Anderson PW, Malley R. Options for inactivation, adjuvant, and route of topical administration of a killed, unencapsulated pneumococcal whole-cell vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2010a;17(6):1005–12.

Lu YJ, Leite L, Gonçalves VM, Dias WO, Liberman C, Fratelli F, Alderson M, Tate A, Maisonneuve JF, Robertson G, Graça R, Sayeed S, Thompson CM, Anderson P, Malley R. GMP-grade pneumococcal whole-cell vaccine injected subcutaneously protects mice from nasopharyngeal colonization and fatal aspiration-sepsis. *Vaccine*. 2010b;28:7468–75.

Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied And Environmental Microbiology*. 1990;56(4):1004-11.

Malley R, Anderson PW. Serotype-independent pneumococcal experimental vaccines that induce cellular as well as humoral immunity. *Proc National Academy of Sciences (PNAS)*. 2012;109(10):3623-7.

Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc National Academy of Sciences (PNAS)*. 2003;100(4):1966–71.

Malley R, Lipsitch M, Bogaert D, Thompson CM, Hermans P, Watkins C, Sethi S, Murphy TF. Serum antipneumococcal antibodies and pneumococcal colonization in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;196:928–35.

Malley R, Lipsitch M, Stack A, Saladino R, Fleisher G, Pelton S, Thompson C, Briles D, Anderson P. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infection and Immunity*. 2001;69(8):4870–3.

Malley R, Srivastava A, Lipsitch M, Thompson CM, Watkins C, Tzianabos A, Anderson PW. Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in

mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. *Infection and Immunity*. 2006;74(4):2187–95.

Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M. CD4⁺ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc National Academy of Sciences (PNAS)*. 2005;102(13):4848–53.

Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH. Pneumolysin: A Double-Edged Sword During the Host-Pathogen Interaction. *Current Molecular Medicine*. 2008;8:497-509.

Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22:411–6.

Mehr S, Wood N. *Streptococcus pneumoniae* – a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Pediatric Respiratory Reviews*. 2012;13:258–64.

Melin M, Jarva H, Siira L, Meri S, Kayhty H, Vakevainen M. *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype 19F is more resistant to C3 deposition and less sensitive to opsonophagocytosis than serotype 6B. *Infection and Immunity*. 2009; 77(2):676–84.

Melin M, Trzcinski K, Antonio M, Meri S, Adegbola R, Kaijalainen T, Kayhty H, Vakevainen M. Serotype-related variation in susceptibility to complement deposition and opsonophagocytosis among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2010;78(12):5252–61

Miyaji EN, Oliveira MLS, Carvalho E, Ho PL. Serotype-independent pneumococcal vaccines. *Cell. Mol. Life Sci*. 2013;70(18):3303-26.

Moffitt KL, Malley R, Lu YJ. Identification of protective pneumococcal Th17 antigens from the soluble fraction of a killed whole cell vaccine. *Plos One*. 2012;7(8):1-7.

Moffitt KL, Malley R. Next generation pneumococcal vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 2011;23:407–13.

Mott M, Caierão J, da Cunha GR, Perez LRR, Matusiak R, de Oliveira KRP, d'Azevedo PA, Dias C. Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014;20:47–51.

NCBI - Nacional Center for Biotechnology Information. Protein [Protein Database]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2014 [cited 2014 Jul 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T, Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374:893–902.

Ohleyer E, Blanch HW, Wilke CR. Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1985;11:317-32.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Informe Regional de SIREVA II, 2010: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Washington, D.C.: OPS, 2011.

Origin. Versão 6.0. EUA: Micrococal Software, Inc. Software

Parente E, Ricciardi A, Addario G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994;41:388-94.

Pericone CD, Overweg K, Hermans PWM, Weiser JN. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infection and Immunity*. 2000;68(7):3990–7.

Perrin P, Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone. *Biologicals*. 1995;23:207-11.

Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9:889-93.

Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine Supplement*. 2005;11(4):S5-S11.

Pollard AJ, Perrett KP, Beverley PC. Maintaining protection against invasive bacteria with protein–polysaccharide conjugate vaccines. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9:213-20.

Rani KY, Rao VSR. Control of fermenters - a review. *Bioprocess Engineering*. 1999;21:77-88.

Rappuoli R, Aderem A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature*. 2011;473:463-9.

Regev-Yochay G, Trzcinski K, Thompson CM, Lipsitch M, Malley R. *Spxb* is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an *in vivo* competitive colonization model. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(18):6532–9.

Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infection and Immunity*. 2004;72(1):114–22.

Riesenberg D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51:422-30.

Robertson BR, Button DK, Koch AL. Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(10):3900–9.

Romero S, Merino E, Bolívar F, Gosset G, Martinez A. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(16):5190–8.

Sablani SS, Goosena MFA, Al-Belushi R, Wilf M. Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review. *Desalination*. 2001;141:269-89.

Sartori AMC, de Soárez 1 PC, Novaes HMD, Cost-effectiveness of introducing the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine into the universal immunization of infants in Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2012;66:210-7.

Scheper TH, Lammers F. Fermentation monitoring and process control. *Current Opinion in Biotechnology*. 1994;5:187-91.

Schmidell W, Facciotti MCR. Biorreatores e processos fermentativos. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotechnologia Industrial*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2001. Vol. 2, cap. 8, p. 179-92.

Silva FH, Moura LF, Badino AC. AnaBio 1.0: um program para análise de biorreatores. In: *Simpósio Nacional de Bioprocessos*; 2003; Florianópolis – SC; Sinaferm; nº do trabalho: 24.

SoftMax. Versão Pro 5.2. EUA: Molecular Devices, LLC. Software

Song JY, Nahm 2 MH, Moseley MA. Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *J Korean Med Sci*. 2013;28:4-15.

Sonnleitner B, Locher G, Fiechter A Biomass determination. *Journal of Biotechnology*. 1992;25:5-22.

Storaï J. Analyse métabolique et transcriptomique de *Streptococcus pneumoniae* en lien avec la production de polysaccharide capsulaire. [thèse (Doctorat Spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries)] Toulouse: L'Université de Toulouse, 2008

Summit. Versão 4.0. EUA: DakoCytomation. Software

Taniai H, Iida KI, Seki M, Saito M, Shiota S, Nakayama H, Yoshida SI. Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: role of lactate as an energy source. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(10):3572-9.

Taniguchi M, Kotani N, Kobayashi T. High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration. *J. Ferment. Technol*. 1987;65(2):179-84.

Tashiro Y, Kaneko W, Sun Y, Shibata K, Inokuma K, Zendo T, Sonomoto K. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89:1741–50.

Thakur A, Pedersen LE, Jungersen G. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine*. 2012;30:4907–20.

Toda K. Theoretical and methodological studies of continuous microbial bioreactors. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2003;49:219-33.

United States Pharmacopeial Convention Inc. (USP). Microbiological Tests: Sterility Tests. In: *The United States Pharmacopeia*. 34th ed. Rockville, MD, EUA; 2011. Section <71>, p. 65-70

van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374:1543–56.

Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clinical Infectious Diseases*. 1993;17:913-24.

Wee YJ, Kim JN, Yun JS, Ryu HW. Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004;35:568–73.

Wee YJ, Ryu HW. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. *Bioresource Technology*. 2009;100:4262–70.

Weidenmaier C, Peschel A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6:276-87.

Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infection and Immunity*. 1994;62(6):2582-9.

Weiser JN, Markiewicz Z, Tuomanen EI, Wani JH. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 1996;64(6):2240–5.

World Association for Vaccine Education – WAVE [Internet]: Vaccine Ingredients; 2008. [Acesso em: 2012 jul. 24]. Disponível em: <http://www.novaccine.com/vaccine-ingredients>.

World Health Organization (WHO). Acute respiratory infections (update September 2009). Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index.html.

World Health Organization (WHO). Target product profile (TPP) for the advance market commitment (AMC) for pneumococcal conjugate vaccines; 2008: 1-38.

World Health Organization (WHO). Weekly epidemiological record. 2012;14(87):129–44.

Xu B, Jahic M, Enfors SO. Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. Biotechnol. Prog. 1999;15:81-90

Xu GQ, Chu J, Wang YH, Zhuang YP, Zhang SL, Peng HQ. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. Process Biochemistry. 2006;41:2458–63.

Yeh HM, Cheng TW, Tsai JW. Modified concentration polarization model for hollow-fiber membrane ultrafiltration. Separation and Purification Technology. 1999;16:189–92.

Yesilkaya H, Spissu F, Carvalho SM, Terra VS, Homer KA, Benisty R, Porat N, Neves AR, Andrew PW. Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence. Infection and Immunity. 2009;77(12):5418–27.

APÊNDICE A – Resumo dos cultivos realizados neste trabalho

Lotes 10L	Tipo de processo	DO máx. atingida	Método de separação celular	Objetivo
F2206	descontínuo	9,80	centrifugação	Avaliar a influência da DO de coleta na qualidade da vacina
F1008	descontínuo	9,86	centrifugação	
F1708	descontínuo	10,1	centrifugação	
F0410	descontínuo	9,32	centrifugação	
F0111	descontínuo alimentado	14,2	centrifugação	Avaliar a influência do modo de operação do biorreator e da DO de coleta na qualidade da vacina
F0911	descontínuo alimentado	15,1	centrifugação	
F2311	descontínuo alimentado	14,3	centrifugação	
F1801	descontínuo alimentado	14,8	centrifugação e microfiltração tangencial	Determinar a causa da formação de grumos no produto final
F2802	descontínuo	10,1	microfiltração tangencial	Coleta do produto final sem a presença de grumos
F2103	descontínuo	6,50	microfiltração tangencial	
F0603	descontínuo alimentado	14,3	microfiltração tangencial	Coleta do produto final sem a presença de grumos
F2703	descontínuo alimentado	5,98	microfiltração tangencial	
F1704	descontínuo alimentado	13,6	microfiltração tangencial	
F0305	contínuo com reciclo	20,3	microfiltração tangencial	Estabelecer as condições do cultivo com reciclo (Condições 1 a 4)
F0905	contínuo com reciclo	24,2	microfiltração tangencial	
F2905	contínuo com reciclo	21,5	microfiltração tangencial	
F1306	contínuo com reciclo	25,4	microfiltração tangencial	
F2407	contínuo com reciclo	30,5	microfiltração tangencial	Replicatas da condição 4 (F1306)
F0708	contínuo com reciclo	33,4	microfiltração tangencial	

Listagem dos cultivos realizados em 60 L e utilizados neste trabalho

Lotes 60 L	Tipo de processo	DO máx. atingida	Método de separação celular
006/09	descontínuo	5,87	microfiltração tangencial
007/09	descontínuo	5,95	microfiltração tangencial
008/09	descontínuo	6,20	microfiltração tangencial
004/10	descontínuo	7,17	microfiltração tangencial
008/10	descontínuo	7,72	microfiltração tangencial
009/10	descontínuo	5,90	microfiltração tangencial

APÊNDICE B – Comparação dos cultivos descontínuos realizados em 60 L e em 10 L

Growth Curve

Streptococcus pneumoniae bench and cGMP fermentations

Growth Rate

Streptococcus pneumoniae bench and cGMP fermentations

Lactate Production

Streptococcus pneumoniae bench and cGMP fermentations

Acetate Production

Streptococcus pneumoniae bench and cGMP fermentations

Residual Glucose

Streptococcus pneumoniae bench and cGMP fermentations

Resultados apresentados no 8th
International Symposium on
Pneumococci and Pneumococcal
Diseases de 11 a 15 de março de
2012

APÊNDICE C – Análise no software AnaBio

Paramêtros selecionados no software:

- cultivo contínuo com reciclo;
- análise de gráficos de concentração versus taxa de diluição ou tempo de residência;
- não há inibição pelo substrato (glicose) ou produto (lactato);
- modelo cinético de Monod;
- produto (lactato) parcialmente associado ao crescimento;
- valores dos parâmetros dos processos descontínuos foram fornecidos ao software para os cálculos;
- $Y_{P/S}$ foi calculado com base na produção de ácidos totais: acetato e lactato, o resultado foi > 1 , porém 1 é o valor máximo permitido pelo software;
- $\mu_{\text{máx.}}$ também foi superior a 1, mas o software não permite valores > 1 ;
- R (razão da vazão do líquido filtrado pelo líquido efluente) foi calculada com base em operações realizadas água e com as bombas peristálticas e o sistemas de mangueiras e fibras-ocas utilizados no processo.

APÊNDICE D – Artigo de periódico

Vaccine 32 (2014) 1113–1120

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability

Viviane M. Gonçalves^{a,1}, Waldely O. Dias^{a,1}, Ivana B. Campos^{b,c}, Celia Liberman^a, Maria E. Sbrogio-Almeida^a, Eliane P. Silva^{a,c}, Celso P. Cardoso Jr.^b, Mark Alderson^d, George Robertson^d, Jean-François Maisonneuve^d, Andrea Tate^d, Porter Anderson^e, Richard Malley^e, Fernando Fratelli^b, Luciana C.C. Leite^{a,*}

^a Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

^b Laboratório Especial Piloto de Produtos Biológicos Recombinantes, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia-USP-IPT-IB, São Paulo, Brazil

^d PATH, Seattle, WA, United States

^e Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2013

Received in revised form 15 October 2013

Accepted 25 October 2013

Available online 14 December 2013

Keywords:

Streptococcus pneumoniae

Whole cell vaccine

cGMP production

ABSTRACT

Pneumococcal infections impose a large burden of disease on the human population, mainly in developing countries, and the current pneumococcal vaccines offer serotype-specific protection, but do not cover all pathogenic strains, leaving populations vulnerable to disease caused by non-vaccine serotypes. The pneumococcal whole cell vaccine is a low-cost strategy based on non-capsular antigens common to all strains, inducing serotype-independent immunity. Therefore, we developed the process for the cGMP production of this cellular vaccine. Initially, three engineering runs and two cGMP runs were performed in 60-L bioreactors, demonstrating the consistency of the production process, as evaluated by the growth curves, glucose consumption and metabolite formation (lactate and acetate). Cell recovery by tangential filtration was $92 \pm 13\%$. We optimized the conditions for beta-propiolactone (BPL) inactivation of the bacterial suspensions, establishing a maximum cell density of OD₆₀₀ between 27 and 30, with a BPL concentration of 1:4000 (v/v) at 150 rpm and 4 °C for 30 h. BPL was hydrolyzed by heating for 2 h at 37 °C. The criteria and methods for quality control were defined using the engineering runs and the cGMP Lots passed all specifications. cGMP vaccine Lots displayed high potency, inducing between 80 and 90% survival in immunized mice when challenged with virulent pneumococci. Sera from mice immunized with the cGMP Lots recognized several pneumococcal proteins in the extract of encapsulated strains by Western blot. The cGMP whole cell antigen bulk and whole cell vaccine product lots were shown to be stable for up to 12 and 18 months, respectively, based upon survival assays following i.p. challenge. Our results show the consistency and stability of the cGMP whole cell pneumococcal vaccine lots and demonstrate the feasibility of production in a developing country setting.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae remains a major public health burden in low-income countries, responsible for bacterial pneumonia, and many cases of otitis media and meningitis [1]. The pneumococcus is a Gram-positive encapsulated diplococcus that colonizes the respiratory mucosa of healthy or ill individuals. Asymptomatic nasopharyngeal carriage is higher in children than adults, in day

care centers than at home, and even higher in children with respiratory infections than in healthy ones [2]. Pneumococcal diseases are considered to result from dissemination of the bacteria from the nasopharynx to the tissues [3]. Usually the respiratory mucosa is highly resistant to invasion by *S. pneumoniae*; however, viral infections, chemical or physical agents can damage the mucosa rendering it less resistant to infection. The major symptoms of pneumococcal disease are caused by an inflammatory response [4].

In developing countries, it is estimated that upper respiratory tract infections are responsible for over 4 million fatalities each year [5], with more than 1 million in children under 5 years of age [6]. The incidence of pneumococcal disease and mortality is higher in children, in the elderly and in immunocompromised individuals. A mortality rate of 5–22% has been associated with the initial

* Corresponding author.

E-mail addresses: luciana.leite@butantan.gov.br, viviane.goncalves@butantan.gov.br (L.C.C. Leite).

¹ These authors contributed equally to this work.

phase of the pneumococcal diseases. Even in cases with antibiotic susceptible strains, there is still a mortality rate of 10% in pneumonia and 30% in meningitis [7]. This situation is aggravated when chemotherapy fails due to antibiotic resistance [8]. The emergence of penicillin-resistant pneumococcal strains is an increasing concern [9].

It is considered that adequate immunity against *S. pneumoniae* requires opsonizing antibodies, complement, a functional spleen and phagocytes; and pathological conditions that interfere with these components predispose to the disease [10]. Capsular polysaccharides (PS) are the basis of serotyping and important virulence factors; therefore, the current vaccines are based on PS, either alone or conjugated to carrier proteins. Indeed, highly immunogenic pneumococcal conjugate vaccines (PCVs), in which the PS antigens are covalently linked with a protein, proved to be highly protective against invasive pneumococcal disease and have dramatically reduced the carriage of vaccine type organisms. However, the seven-valent PCV (PCV7) provides protection against serotypes included in the vaccine, but has resulted in non-vaccine serotype emergence and/or replacement [11–13]. This limitation and global variation in serotype distribution of disease led to the development of PCV-10 and PCV-13. On the other hand, it has been shown that there is not a consistent correlation between anticapsular antibodies and protection [14]. The potential involvement of secretory antibodies, cell-mediated immunity and cytokines should be considered and the combination of different antigenic components could lead to a more efficient non-serotype-specific formulation. The final selection of vaccine components should consider not only their immunogenicity, but also the simplicity of the manufacturing process and its adequate integration into expanded program on immunization (EPI) schedules.

In this context, researchers at the Boston Children's Hospital, proposed the use of an inactivated non-encapsulated strain of *S. pneumoniae*, as a vaccine against pneumococcus. This vaccine preparation induces both humoral and cellular immune responses against multiple antigens conserved among serotypes, and protects mice in various challenge models: colonization, pulmonary pneumonia and sepsis [15–17]. Instituto Butantan, in collaboration with the Boston group and with support from PATH, has developed the process for pilot scale production of this pneumococcal vaccine in 60-liter bioreactors under current Good Manufacturing Practices (cGMP). This study was conducted to evaluate the consistency of the downstream process and the stability of the final product including biochemical assays and pre-clinical tests of immunogenicity and protection. The simplicity of the production process should provide a low-cost product that could be incorporated into the public health system of developing countries for prevention of pneumococcal disease.

2. Methods

2.1. Microorganism

The *S. pneumoniae* RM200 (Rx1 PdT Δ lytA) strain is a derivative of a spontaneous non-encapsulated Rx1 strain, which was genetically engineered for autolysin deficiency (Δ lytA) and had pneumolysin substituted by a non-toxic pneumolysoid derivative, PdT [17].

2.2. Culture media and washing buffer

The animal-free culture medium [19] was composed of 20 g/L of enzymatically hydrolyzed soybean meal (Soytone, BD-Difco), 20 g/L yeast extract (BD-Difco), 20 g/L glucose, 0.01 g/L choline (Sigma), 1.0 mL/L thioglycolic acid 10%, v/v (Carlo Erba), 625 mg/L

glutamine, 100 mg/L anhydrous asparagine, 3.82 g/L anhydrous K_2HPO_4 , 1 g/L $NaHCO_3$, 500 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.8 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.36 mg/L $MnSO_4 \cdot H_2O$. The washing buffer was lactated Ringer's solution composed of 5 g/L NaCl, 0.3 g/L KCl, 0.2 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 3 g/L sodium lactate and 2 g/L glucose additional. All reagents were of analytical grade and supplied by Merck.

2.3. Culture conditions and downstream process

The cultures were carried out in a 60-L bioreactor BioFlo5000 (New Brunswick Scientific, USA) with automatic control of pH, temperature and stirring speed. The inoculum was prepared from a cryopreserved working cell bank vial in 20 mL of culture medium and incubated at 36.5 °C until the cell growth reached an optical density at 600 nm (OD) of 2.5. This culture was then inoculated in 3.5 L of culture medium in a flask without oxygen for static cultivation until OD 2.0 and introduced as inoculum into the bioreactor in order to obtain an initial OD of 0.1. The bioreactor cultivation was performed at 36 °C (± 1 °C), 0.1 vvm N_2 , 110 rpm and the pH was controlled at 7.0 by the addition of 10 M NaOH. Polypropylene glycol (Fluent Cane 114, Brenntag, Germany) was used as an antifoam agent.

The cells were harvested at $OD\ 6.6 \pm 1.0$, concentrated 6 times the initial volume via tangential flow microfiltration using 2 cartridges of a 0.1- μ m membrane hollow fiber with 4.2 m² of total filtration area (CFP-1-E-55A, GE Health Care, USA) and the cells were submitted to 6 washing steps with Ringer's lactate plus 0.2% (w/v) glucose. A rotary lobe pump (optilobe32, Alfa Laval) was used to generate an average feed flow rate of 7.5 L/min and 1 L/min of permeate flow rate. During the operation, the inlet pressure was 5–7 psi and the retentate pressure, 4–6 psi. After eliminating the culture medium, the cell suspension was adjusted to the appropriate OD with the Ringer's lactate/glucose buffer. During the cultivation and after concentration, purity was analyzed by Gram staining and serial dilutions of the samples were plated on blood BHI-agar, incubated for 3 days at 36 °C to check colony morphology, purity and viability.

2.4. Establishment of the optimal β -propiolactone (BPL) concentration

The concentrated cell suspension was adjusted to an OD of approximately 32 and 200 mL aliquots were distributed in 500-mL Schott flasks. Each flask received a different concentration of BPL: 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 and 1:8000 (v/v) and was incubated in a shaker (TE-140, Tecnal, Brazil) at 150 rpm and 4 °C for 24 h. Samples were taken every 2–4 h, serially diluted and plated to determine viable cell counts.

2.5. Establishment of the upper limit of OD for BPL inactivation

Samples of concentrated cell suspensions from different production lots were adjusted to the ODs 42, 36, 32 and 27, using lactated Ringer's solution plus 0.2% (w/v) glucose. These 200-mL samples received the optimal BPL concentration and were incubated in a rotating shaker (TE-140, Tecnal, Brazil) at 150 rpm and 4 °C for 24–30 h. Samples were taken every 2–4 h, serially diluted and plated to determine viable cell counts.

The conditions established for inactivation were then applied to the 60-L scale, keeping the same stirring regime with a larger rotating shaker (Martinez Taboada, Brazil), the same temperature and the same ratio between flask diameter and height of liquid.

2.6. Elimination of residual BPL

Residual BPL was hydrolyzed by incubation at 37 °C. The bulk suspension was equilibrated in a water bath and then transferred to 50-L Flexboy bags (Sartorius) for further incubation at 37 °C for 2 h, with gentle stirring to complete the inactivation of BPL.

2.7. Viable cell counting

The cell suspension was appropriately diluted and plated on blood agar plates [5% (v/v) sheep blood] enriched with brain heart infusion (BD/Difco). The plates were incubated in 3% (v/v) CO₂ at 36 °C for up to 3 days and the colony forming units per mL (CFU/mL) were recorded.

2.8. Analytical methods

Culture samples were taken during the cultivation to measure the OD, and following centrifugation at 18,407 g for 5 min, samples of the supernatants were stored at –20 °C until analysis. Samples were analyzed for glucose, lactate and acetate by high-performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu) using an Aminex HPX 87H column (300 mm × 7.8 mm, BioRad) at 60 °C, and 5 mM H₂SO₄ solution was used as mobile phase with a flow rate of 0.6 mL/min. Glucose was detected by refractive index and organic acids by UV at 210 nm.

2.9. Quality control methods

Samples from all engineering and cGMP Lots were analyzed by Instituto Butantan's Quality Control Section. The identity of the microorganism by Vitek system (Biomérieux, France) and the purity by Gram staining were checked prior to inactivation. Total and soluble protein contents were measured by Kjeldahl and Lowry methods, respectively. Aspect, pH and optical density at 600 nm were also analyzed. Bacterial and fungal sterility were analyzed by direct inoculation, using Fluid Thioglycollate medium and Soybean-Casein Digest medium for cultivation and sub-cultivation at 30–35 °C and 20–25 °C for 14 days each, according to United States Pharmacopeia (USP <71>). Endotoxin was analyzed by kinetic-turbidimetric method using Endosafe kit (Charles River, USA). The immunogenicity of the vaccine was analyzed by induction of serum IgG antibodies and the potency by survival of immunized animals and controls after challenge with a virulent *S. pneumoniae* strain, as described below. The acceptance criteria for all tests were established by Boston Children's Hospital, Instituto Butantan and PATH and are described in Table 2.

2.10. Immunization, evaluation of IgG antibodies and challenge procedures

Groups of 10 BALB/c female mice were subcutaneously immunized with samples obtained from drug substance batches (*S. pneumoniae* whole cell antigen – WCA), the Engineering Lot 005/09 Bulk and the cGMP Lot 009/10 Bulk, and its filled and formulated drug product (*S. pneumoniae* whole cell vaccine – WCV), the cGMP Lot 1103054. These samples were diluted in Phosphate buffered saline (PBS), using aluminum hydroxide as adjuvant (1.2 mg/mL). Initially, two doses of the vaccines were tested (1 µg or 10 µg of total protein per animal, in 200 µL) with two injections, 2 weeks apart. Based upon initial results, the dose of 10 µg/animal was used in the subsequent assays. The control groups received PBS with adjuvant.

Two weeks after the last immunization, the animals were bled by retro-orbital puncture for evaluation of serum IgG and then challenged with live encapsulated *S. pneumoniae* A066 strain

(1.2×10^4 cells/0.5 mL, intraperitoneally). The mice were observed for survival during 10 days. IgG titers were measured by ELISA against the whole cell pneumococcal antigen.

Briefly, 96-well plates (Costar®, USA) were coated with WCA (3×10^9 cells/mL) in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6, overnight at 4 °C followed by 30 min at 37 °C. After washing three times with PBS/Tween buffer (1.37 mM NaCl/2.7 mM KCl/1.5 mM Na₂HPO₄/KHPO₄ + 0.1% (v/v) Tween₂₀), PBS-T, the wells were blocked with 10% (w/v) non-fat dry milk in PBS and then incubated with serial dilutions of the immunized mouse sera in PBS/10% (w/v) bovine serum albumin (PBS/BSA) at 37 °C for 1 h. The plates were washed as described above and incubated with goat anti-mouse IgG peroxidase (1:2000) (Sigma) in PBS/BSA at 37 °C for 1 h. Following washing, antibodies were visualized by adding o-phenylenediamine (OPD) substrate (50 µL; 0.04% (w/v) OPD in citrate phosphate buffer [pH 5], containing 0.01% (v/v) H₂O₂). After color development (15 min), the reaction was interrupted by addition of 8 M H₂SO₄ (50 µL), and the A_{492 nm} determined. IgG antibody titers were expressed as the end-point dilution of each serum with OD_{492 nm} ≥ 0.1. Log titers were plotted for each sample.

2.11. Western blot

Pooled sera from the mice immunized with samples of WCV were analyzed by Western blot against (i) *S. pneumoniae* strains: 14, 3, and 23F; and (ii) purified recombinant *S. pneumoniae* proteins: Pneumococcal surface protein A (PspA), Pneumococcal surface antigen A (PsaA) and Pneumolysin (PdT). Briefly, samples of bacterial cultures of *S. pneumoniae* from the different strains were obtained at OD between 0.3 and 0.5. The pellets obtained after centrifugation of these cultures were resuspended in PBS to an OD = 10 and 20 µL of these suspensions were loaded onto a 12% (w/v) polyacrylamide gel and separated by electrophoresis. The recombinant proteins were applied to the gel at a concentration of 10 µg/20 µL of sample. The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with anti-WCV pooled polyclonal antisera. Bands were visualized with an ECL Kit (GE).

2.12. Statistical analysis

The statistical significance of differences in antibody titers between the studied groups was analyzed using the Mann–Whitney test (significant *p*-values < 0.05). Differences between groups in the protection assays were evaluated using Fisher's exact test.

3. Results

3.1. Consistency of 60-L fermentations and concentration processes

We performed three engineering runs and two cGMP runs in 60-L cultures of *S. pneumoniae* RM200 (Rx1 PdT Δ*lytA*) strain for production of WCA and WCV. Cultures were grown until OD 6.6 ± 1.0 , concentrated and washed using a 0.1-µm hollow-fiber apparatus to a volume of 12 L, with a final OD of 30 ± 5 . Analysis of these five cultures showed comparable growth curves, glucose consumption and production of acetate and lactate (Figs. 1 and 2). The average maximum specific growth rate during exponential phase was 1.05 h^{-1} . Pilot production lots contained approximately 10^9 CFU/mL at the beginning of concentration, and the average product recovery in pilot lots was 92% ($\pm 13\%$) after concentration and washing procedures (Table 1). Values higher than 100% can occur due to the fact that the bacteria continue growing after the final OD in the fermentor is measured and during the concentration

Fig. 1. Time profile of optical density of *S. pneumoniae* RM200 culture in a 60-L bioreactor (A) and average maximum specific growth rate $\mu_{\max}$ (B) of five production lots. Filled symbols represent data from engineering runs and open symbols, cGMP runs.

Fig. 2. Time profile of residual glucose (A), lactate (B) and acetate (C) production during *S. pneumoniae* RM200 culture in a 60-L bioreactor of five production lots. Filled symbols represent data from engineering runs and open symbols, cGMP runs.

Table 1

Recovery of cell suspension in various lots after concentration and washing steps for pneumococcal whole cell vaccine production.

	OD at harvest	OD of concentrated cell suspension	Concentrated volume (L)	Recovery (%)
Lot 005/09	8.23	36.0	12.0	81
Lot 006/09	5.87	26.5	13.0	90
Lot 007/09	5.95	36.0	10.2	95
Lot 004/10	7.17	35.0	15.3	115
Lot 009/10	5.90	27.8	11.3	82

step, before all the nutrients have been removed by the washing steps.

3.2. Establishment of conditions for BPL inactivation of bacterial concentrates

We first determined the optimal concentration of BPL for inactivation of the bacterial concentrates. Our results show that concentrations of 1:1000, 1:2000, 1:3000 and 1:4000, but not 1:8000, can inactivate the pneumococcal cells in 24 h. Fig. 3A shows an experiment representative of four, which were performed using concentrated samples from 60-L fermentations. Based upon these

Fig. 3. Conditions for BPL inactivation of bacterial concentrates. (A) Concentration of BPL required for inactivation of pneumococcal cells. Cells were plated on BHI/blood agar to determine viable cell counts. The concentrations of 1:1000 (solid circles) and 1:8000 (solid diamonds) were tested in samples from Lot 006/09; the others in samples from Lot 005/10; both had initial $OD_{600} = 27$. (B) Establishment of the upper limit of OD_{600} at 60 L. BPL was added at 1:4000 at different initial OD_{600} cell concentrations. Cells were plated on BHI/blood agar to determine viable counts.

Table 2
Specification results for engineering and cGMP Lots.

Parameter	Test method	Acceptance criteria	Result WCA Lot 005/09	Result WCA Lot 009/10	Result WCV Lot 1103054
Identity	Identity (prior to inactivation) (VITEK)	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Strength	Total protein (Kjeldahl method)	WCA > 7.0 mg/mL WCV > 4.5 mg/mL	12.3 mg/mL	9.06 mg/mL	4.86 mg/mL
	Soluble protein (Lowry method)	WCA 0.7–3.0 mg/mL WCV 0.4–1.5 mg/mL	1.70 mg/mL	1.69 mg/mL	1.23 mg/mL
Quality	Aspect	Opalescent suspension	Opalescent suspension	Opalescent suspension	Opalescent suspension
	pH	5.0–7.0	5.1	6.7	7.0
	Viability (prior to inactivation)	>10 ⁹ CFU/mL	ND	3.42 × 10 ⁹	NA
	Optical density _{600nm} (prior to inactivation)	>26.0	36.0	27.8	NA
Purity	Gram stain and morphology	Gram positive diplococcus	Gram positive diplococcus	Gram positive diplococcus	Gram positive diplococcus
Safety	Endotoxin (LAL)	<125 EU/mL	12.5–125 EU/mL	50 EU/mL	20 EU/mL
	Sterility	No growth	No growth	No growth	No growth
Activity	Potency	>70% Survival	85%	80%	90% ^a

ND – not determined; NA – not applied.

^a This value was determined at 6 months because the value at T_0 was not determined.

results, a concentration of 1:4000 (v/v) of BPL was deemed appropriate for production of WCA.

Several 60-L fermentations were performed and concentrated to different initial ODs and samples were taken to perform the inactivation studies. As can be seen in Fig. 3B, OD was not totally in accordance with CFU (as has been previously reported [19]). Of the 5 conditions tested, 2 were not inactivated after 24 h, which were at OD > 30 and CFU/mL > 10¹⁰. The results indicated that it is important to maintain the OD below 30 and to increase the incubation time to 30 h to guarantee inactivation even if the CFU is higher than 10¹⁰, since it is not possible to know the results of viable counting before the end of the incubation time.

Therefore we conclude that the conditions for BPL inactivation should be a concentration of 1:4000 (v/v) BPL in a bulk preparation at OD₆₀₀ between 27 and 30 with shaking at 150 rpm and 4 °C for 30 h. Residual BPL is then hydrolyzed by incubation at 37 °C.

3.3. Quality control of engineering and cGMP runs of WCA and WCV

Engineering and cGMP Lots were analyzed according to parameters such as identity, strength, quality, safety, purity and activity, previously established by the collaborating Institutions, Boston Children's Hospital, Instituto Butantan and PATH. The results shown in Table 2 demonstrate that the bulk preparation of WCA Engineering Lot 005/09 met all the established Acceptance Criteria of the Specifications. The bulk cell suspension was shown to be *S. pneumoniae*, with an OD of 36 upon concentration before vaccine preparation and a pure Gram-positive diplococcus afterwards. The WCA bulk was an opalescent suspension at a pH of 5.1, with a total protein concentration of 12.3 mg/mL measured by Kjeldahl, with 1.70 mg/mL as soluble protein quantified by Lowry. This vaccine preparation was shown to be sterile and the concentration of endotoxin was low, within the specifications. The WCA from Lot 005/09 was later evaluated for its protective potential.

The cGMP bulk preparation of WCA Lot 009/10, was also analyzed by Quality Control under the same parameters as Lot 005/09. In this case, optimization of the conditions for BPL inactivation of the cell culture had been completed. Therefore, the bulk cell suspension identified as *S. pneumoniae* was concentrated to an OD of 27.8. The final vaccine bulk had a pH of 6.7 and was determined to have 9.06 mg/mL of total protein, of which 1.69 mg/mL was in

the soluble fraction. This vaccine preparation was shown to be sterile and the concentration of endotoxin was within the specifications. WCA Lot 009/10 passed all the specifications, allowing it to be formulated and filled (Table 2).

cGMP WCV Lot 1103054 was formulated to 5.0 ± 0.5 mg/mL of total protein by dilution in saline and filled in 5.0 mL glass vials, and then stored at –80 °C until use. Samples of WCV analyzed by Quality Control were shown to be an opalescent suspension of pure Gram-positive diplococcus at a pH of 7.0, with a total protein concentration of 4.86 mg/mL, with 1.23 mg/mL as soluble protein. This vaccine preparation was shown to be sterile and the concentration of endotoxin was low, within the specifications, demonstrating that the product passed all the required Specifications (Table 2).

3.4. Immunogenicity, potency and sustainability elicited by WCA and WCV preparations

The Engineering Lot 005/09 was evaluated for induction of serum IgG and protection in mice immunized with WCA doses of 1 µg or 10 µg of total protein per animal and challenged with live encapsulated *S. pneumoniae* A066 strain. Significant IgG antibody titers against the whole cell antigen were obtained with an apparent dose-response (Fig. 4A). The lower dose (1 µg) induced a non-significant survival of 30% after challenge and the higher dose (10 µg) 85% (Fig. 4B). The potency of the vaccine was also evaluated after storage at –80 °C and at 4 °C for 9 months. Under these conditions no significant difference was observed in the induction of antibodies by the vaccine maintained at these temperatures (Fig. 4C), and the vaccine was still protective (Fig. 4D).

Potency of the cGMP Lot 009/10 Bulk was evaluated at a dose of 10 µg/animal at time zero (T_0), with samples used after freezing at –80 °C, and after 12 months at –80 °C. The serum antibody titers induced by the vaccine increased after 12 months of storage (Fig. 5A). At T_0 the vaccine induced 80% of survival in immunized mice (Fig. 5A), and the protective potency was preserved after 12 months maintained at –80 °C, inducing 70% of survival, a non-statistical difference (Fig. 5B).

cGMP Lot 009/10 was formulated and filled to produce cGMP Lot 1103054, which was also evaluated for immunogenicity and potency under similar conditions, after 6 and 18 months at –80 °C. In this case, a significant increase in antibody titers against the whole cell vaccine was observed after 18 months (Fig. 6A). The formulated and filled cGMP WCV product was protective,

Fig. 4. Potency evaluation of engineering WCA Lot 005/09 Bulk at T_0 , vaccine doses of 1 and 10 µg/mouse: (A) IgG titers; (B) survival after challenge. Stability evaluation of Lot 005/09 after 9 months at -80°C and 4°C : (C) IgG titers; (D) Survival after challenge.

Fig. 5. Potency and stability evaluation of cGMP WCA Lot 009/10 Bulk at T_0 and after 12 months at -80°C : (A) IgG titers and (B) Survival after challenge.

inducing 90% of survival after 6 months, and after 18 months stored at -80°C it still induced 100% protection in challenged mice (Fig. 6B). The WCV was also evaluated for accelerated stability at 25°C . After 3 months at 25°C , Lot 1103054 induced only 50% of survival and after 6 months at this temperature, induced higher antibody titers against the whole cell vaccine, but only 20% survival (Fig. 6C and D).

3.5. Identification of *S. pneumoniae* proteins by anti-WCV immune sera

Pooled sera from mice immunized with WCV were able to detect, by Western blot, electrophoretically separated proteins

from strains of *S. pneumoniae* belonging to different serotypes prevalent in children (Serotype 14), adults (Serotype 3) and with antibiotic resistance (Serotype 23), as well as *S. pneumoniae* purified recombinant proteins, PspA, PsaA and PdT (Fig. 7).

4. Discussion

The currently available pneumococcal vaccines based on capsular polysaccharides involve multiple components due to serotype specificity and require complex manufacturing procedures leading to elevated costs and restricting their use in developing countries. The previously described non-encapsulated inactivated whole cell

Fig. 6. Stability Evaluation of cGMP WCV Lot 1103054 maintained 6 and 18 months at -80°C : (A) IgG titers; (B) survival after challenge. Accelerated stability evaluation of WCV Lot 1103054 maintained 3 and 6 months at 25°C : (C) IgG titers; (D) survival after challenge.

Fig. 7. Western blot analysis of *S. pneumoniae* extracts and purified recombinant proteins recognition by anti-WCV polyclonal antibody. Lanes 1–3: Pneumococcal strains serotypes 14, 3 and 23F. Lanes 4–6: recombinant Pneumococcal Surface Protein A, PspA; recombinant Pneumococcal Surface Antigen A, PsaA; recombinant Pneumolysin, PdT.

pneumococcal vaccine induces non-serotype specific immunity against several antigens common to all serotypes and can be manufactured by a simple procedure [15–18]. Although the precise cost of this new pneumococcal vaccine still needs to be established, our estimates based upon current yields are that, it should be in the same order of magnitude as the whole cell pertussis vaccine, which is a highly cost-effective vaccine, since the production processes

of both are similar. Hence, it should be at least an order of magnitude lower than prices of the pneumococcal conjugate vaccines currently provided to GAVI.

Also, this vaccine can be considered relatively safe in comparison to the whole cell pertussis vaccine, because pneumococcus is a Gram-positive bacterium and does not contain lipopolysaccharide, the major component responsible for the reactogenicity of the pertussis vaccine. Therefore, the whole cell pneumococcal vaccine is expected to be much less reactogenic than the whole cell pertussis vaccine. Furthermore, the only known toxin harbored by pneumococcus is pneumolysin; however in this vaccine, this protein has been substituted by its non-toxic derivative, PdT. Consequently, although this is a technology used for the first generation vaccines, it can be considered relatively safe, most probably safer than the whole cell pertussis vaccine.

We had previously evaluated the production process for WCA from *S. pneumoniae* cultures at a 5-L scale [19]. In this study, we established the scale-up to 60-L and evaluated the consistency of the cultivation and downstream processing for the production of the WCA in three engineering runs and two cGMP runs, demonstrating it to be a robust process, with high recovery after washing and concentration. The results obtained at the 60-L scale were comparable to our previous results at the 5-L scale. They showed the same OD and the same amount of acetate and lactate production after 4 h of cultivation at the time of harvesting [19]. Further studies are being conducted in order to increase the cell density of the culture and, consequently, the yield of doses produced by fermentation lot.

Previously, different agents had been evaluated to inactivate pneumococci [18]; since BPL was shown to be as efficient as the other agents: ethanol, chloroform and trichloroethylene, it was

chosen because it is easily hydrolyzed by heating, unlike other reagents that must be separated by washing steps, which also removes soluble antigens. BPL has frequently been used to inactivate viruses for use in vaccines, such as Rabies and Influenza [20,21]. In bacteria, it has been used as an inactivating agent for a *Streptococcus equi* veterinary vaccine [22] and it has been employed as a mutagenic agent [23]. It was therefore necessary to establish the conditions for inactivation of pneumococcus. Our results demonstrated that at an OD between 27 and 30 in bulk concentrate, a 1:4000 BPL dilution with shaking at 150 rpm and 4 °C for 30 h provided efficient inactivation of the pneumococcal suspension at 60-L scale. These conditions will probably have to be further optimized when undergoing another step of scale-up.

Quality control evaluation of the engineering and cGMP Lots validated parameters such as identity, strength, quality, safety and purity, previously defined by the collaborating groups. These Lots were shown to be highly immunogenic and protective, demonstrating that the increase in scale maintained all the immunogenic properties of the vaccine.

We also evaluated the stability of the vaccine preparations produced. Our results showed that the bulk cGMP WCA preparation was stable at –80 °C for at least one year and the filled cGMP WCV preparation was also stable at –80 °C for at least 18 months. In the accelerated stability test, the filled WCV lost protective activity by 3 months at 25 °C; this could be due to activation of a protease at this temperature, since the bulk WCA (Lot 005/09) was stable for up to 9 months at 4 °C. IgG titers were enhanced in this period, which could be ascribed to an increased release of intracellular proteins, consequently augmenting their exposure to the immune system.

Therefore, the whole cell pneumococcal vaccines produced at the 60-L scale and under cGMP conditions were as immunogenic and protective as the same vaccine produced at bench scale [17,18]. On a whole, these results attest the consistency of the production process and the quality and stability of the vaccine preparations, which were shown to be adequate for use in clinical trials.

Acknowledgments

The authors acknowledge São Paulo Research Foundation (FAPESP grants 03/07447-9 and 08/10364-1), Butantan Foundation and PATH for financial support.

References

- [1] World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2007;82:93–104.
- [2] Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis 2004;4(March (3)): 144–54.
- [3] Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat Rev Microbiol 2008;6(4):288–301.
- [4] Weiser JN. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. J Mol Med 2010;88:97–102.
- [5] World Health Organization. The World Health Report 2004 – Changing History. Geneva, Austria: WHO; 2004. p. 120–6.
- [6] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. Lancet 2009;374(September (9693)): 893–902.
- [7] Lee CJ, Banks SD, Lee JP. Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. Crit Rev Microbiol 1991;18(2):89–114.
- [8] Spika JS, Facklam RR, Pikaytis BD, Oxtoby MJ, Party PSW. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1979–1987. J Infect Dis 1991;163:1273–8.
- [9] Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes, and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a thirty-year period. Clin Microbiol Infect 2010;16:402–10.
- [10] Obaro SK, Henderson DC, Monteil M. The pneumococcal problem: a review. BMJ 1996;312:1521–5.
- [11] Alexandre C, Dubos F, Courouble C, Pruvost I, Varon E. Hospital Network for Evaluating the Management of Common Childhood Diseases, Martinot A. Rebound in the incidence of pneumococcal meningitis in northern France: effect of serotype replacement. Acta Paediatrica 2010;99: 1686–90.
- [12] Leach AJ, Morris PS, McCallum GB, Wilson CA, Stubbs L, Beissbarth J, et al. Emerging pneumococcal carriage serotypes in a high-risk population receiving universal 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent polysaccharide vaccine since 2001. BMC Infect Dis 2009;9:121.
- [13] Munoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia JJ, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. Clin Infect Dis 2008;46(2):174–82.
- [14] Lipsitch M, Whitney CG, Zell E, Kaijalainen T, Dagan R, Malley R. Are anticapsular antibodies the primary mechanism of protection against invasive pneumococcal disease? PLoS Med 2005;2(January (1)):e15.
- [15] Malley R, Lipsitch M, Stack A, Saladino R, Fleisher G, Pelton S, Thompson C, Briles D, Anderson P. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. Infect Immun 2001;69:4870–3.
- [16] Malley R, Morse SC, Leite LCC, Areas AP, Ho PL, Kubrusly FS, Almeida IC, Anderson P. Evaluation of adjuvants given intranasally with killed noncapsulated pneumococci in multi-serotype protection of mice against colonization and middle ear infection. Infect Immun 2004;72:4290–2.
- [17] Lu YJ, Leite L, Gonçalves VM, Dias WO, Liberman C, Fratelli F, Alderson M, Tate A, Maisonneuve JF, Robertson G, Graca R, Sayeed S, Thompson CM, Anderson P, Malley R. GMP-grade pneumococcal whole-cell vaccine injected subcutaneously protects mice from nasopharyngeal colonization and fatal aspiration-sepsis. Vaccine 2010;28(47):7468–75.
- [18] Lu YJ, Yadav P, Clements JD, Forte S, Srivastava A, Thompson CM, Seid R, Look J, Alderson M, Tate A, Maisonneuve JF, Robertson G, Anderson P, Malley R. Options for inactivation, adjuvant, and route of topical administration of a killed, unencapsulated pneumococcal whole-cell vaccine. Clin Vaccine Immunol 2010;17(6):1005–12.
- [19] Liberman C, Takagi M, Cabrera-Crespo J, Sbrogio-Almeida ME, Dias WO, Leite LCC, Gonçalves VM. Pneumococcal whole-cell vaccine: optimization of cell growth of unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* in bioreactor using animal-free medium. J Ind Microbiol Biotechnol 2008;35(11):1441–5.
- [20] Frazzatti-Gallina NM, Mourão-Fuchas RM, Paoli RL, Silva ML, Miyaki C, Valentini EJ, Raw I, Higashi HG. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Vaccine 2004;22(4):511–7.
- [21] Budowsky EI, Smirnov YuA, Shenderovich SF. Principles of selective inactivation of viral genome. VIII. The influence of beta-propiolactone on immunogenic and protective activities of influenza virus. Vaccine 1993;11(3):343–8.
- [22] Srivastava SK, Barnum DA. Studies on the immunogenicity of *Streptococcus equi* vaccines in foals. Can J Comp Med 1985;49(4):351–6.
- [23] Brusick DJ. The genetic properties of beta-propiolactone. Mutat Res 1977;39(3–4):241–55.