UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentação

**Cultivo de célula bhk-21 c13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino
adaptada para crescimento em suspensão**

Jaci Leme

Dissertação para obtenção do título de Mestre
em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de concentração:
Tecnologia de Fermentações.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

Co-Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentação

**Cultivo de célula bhk-21 c13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino
adaptada para crescimento em suspensão**

Jaci Leme

Versão corrigida

Dissertação para obtenção do título de Mestre
em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de concentração:
Tecnologia de Fermentações.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

Co-Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Leme, Jaci

L551c Cultivo da célula BHK21-C13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino adaptada para crescimento em suspensão / Jaci Leme -- São Paulo, 2016.
59p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Stephano, Marco Antônio

Co-orientador: Tonso, Aldo

1. Biotecnologia 2. Tecnologia da fermentação 3. Cultura de células animais I. T. II. Stephano, Marco Antônio, orientador.

III. Tonso, Aldo, co-orientador.

660.6 CDD

Jaci Leme

**Cultivo de célula bhk-21 c13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino
adaptada para crescimento em suspensão**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre
Prof. Dr. Marco Antônio Stephano
orientador/presidente**

Dr. Renato Mancini Astray

1o. examinador

Dra. Soraia Atie Calil Jorge

2o. examinador

São Paulo, 14 de dezembro de 2016

À minha querida esposa Maria de Fátima,
dedico mais este sonho que sonhamos
juntos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo, tudo mesmo.

Ao Professor Doutor Marco Antônio Stephano, pela orientação pela amizade e pela paciência.

Ao Professor Doutor Aldo Tonso, pela orientação pela amizade e pela disposição em mostrar caminhos.

Ao Professor Doutor Eutímio Gustavo Fernandez Nuñez, pela amizade e por ser motivo de inspiração para esta jornada.

Ao diretor do laboratório de Imunologia Viral (LIV) do Instituto Butantan, Dr. Renato Mancini Astray pelas dicas importantes.

À Dra. Sandra Fernanda Suarez Patiño, pela colaboração com as células.

Ao colega Ms. Alexandre Gonçalves de Rezende, pela disposição em ajudar.

À Vera Lucia Bondorini, pela amizade e colaboração.

Aos professores que ministraram todas as disciplinas, que deram suporte a esta dissertação.

A todos os colegas do mestrado pelo companheirismo pela amizade.

À minha esposa Maria de Fátima pelo companheirismo e pela cumplicidade.

Ao meu filho Pedro Henrique, que com entusiasmo sempre me inspirou a continuar e a não desistir jamais.

A meu filho João Vitor, que com sua determinação me ensinou a lutar por um sonho.

Às minhas irmãs, Maria José, Isabel e Ivone, que juntas traduzem o que há de mais sublime na palavra família.

A meus pais, Sebastião e Matilde, *in memoriam*, que me ensinaram a trilhar o caminho da justiça, da honestidade e da humildade.

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a execução desse projeto.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Marthin Luther King)

RESUMO

Leme, Jaci. **Cultivo de célula bhk-21 c13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino adaptada para crescimento em suspensão** 2016. 59f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016

Células de mamíferos são os hospedeiros mais frequentemente utilizados para a fabricação de proteínas biofarmacêuticas e para a produção de vacinas virais. A qualidade é um elemento-chave para o estabelecimento de um processo de bioconversão eficiente. No presente trabalho utilizamos a linhagem de células BHK-21C13 (*Baby Hamster Kidney*) adaptadas para cultivo em suspensão. O uso de Soro Fetal Bovino (SFB) é tradicionalmente utilizado, sendo considerado um suplemento universal, pois permite o crescimento em várias linhagens de células de mamíferos; porém, uso de SFB apresenta risco de infecção por prions, variabilidade entre lotes e aumento no custo em etapa de purificação (*Downstream processing*). O objetivo do presente trabalho foi comparar o cultivo de células BHK-21 C13 entre dois meios suplementados com SFB e sem SFB, através do estudo cinético para cultivo em suspensão estático e agitado com frascoT, frasco *spinner* e biorreator, respectivamente. Os parâmetros; $X_{\text{máx}}$ e $\mu_{\text{máx}}$, não foram significativamente influenciados pelo meio de cultura em cultivo estático, em cultivo com agitação em frasco *spinner* e também no cultivo em biorreator. O tempo de duplicação ficou próximo para todas as condições testadas. A produtividade alcançada foi: $0,032 \times 10^6$ cel/mL.h⁻¹ para o meio com SFB e $0,031 \times 10^6$ cel/mL.h⁻¹ para o meio sem SFB. Ao final do processo foi possível obter uma concentração celular em torno de $4,7 \times 10^6$ cel/mL, tanto para o cultivo com SFB quanto para o cultivo sem SFB. Dessa forma, o uso de meio de cultivo sem SFB não alterou os principais parâmetros cinéticos, não apresentando as desvantagens do uso do SFB.

Palavras-chave: Meios de cultura livres de soro, células de mamíferos, BHK-21C13, cultura celular estática e agitada, cultura de células de suspensão, frasco de *spinner*, biorreator.

ABSTRACT

Leme, Jaci. **Cell bhk-21 c13 culture in the means of free culture of fetal bovine serum adapted for suspension growth** 2016.59f.Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016

Mammalian cells are the most frequently used hosts for the production of biopharmaceutical proteins and viral vaccines. Quality is a key element for the establishment of an efficient bioconversion process. In this work, we used the cell line Baby Hamster Kidney C13 (BHK-21 C13) adapted to suspension culture was used. Fetal Bovine Serum (FBS) is traditionally used and it is considered a universal insert due to its power to increase cell growth in this kind of animal cells. However, the utilization of FBS introduces risks of infection from prions, variability between batches and increase in cost associated to purification stages (downstream processing). This work aimed to compare the kinetic behaviors of BHK-21 C13 cells in two media supplemented with FBS and without FBS using both one static and two suspension systems, T-flask, spinner flask and bioreactor respectively. The parameters; $X_{\max}$ and $\mu_{\max}$ were not significantly influenced by the culture medium in T- flask culture static, in spinner flask cultivation and were neither significantly influenced by growing in culture media stirred bioreactor. The doubling time was close to all conditions tested. At the end of the growth phase it was possible to obtain a nearby cell concentration of 4.7×10^6 cells / ml, both for cultivation with FBS as for FBS without cultivation. Thus, the use of culture medium without FBS did not affect the main kinetic parameters. Besides, it does not show the disadvantages of culture media using FBS.

Keywords: serum-free culture media, mammalian cells, BHK-21C13, and stirred static cell culture, cell suspension culture, spinner flask bioreactors

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Diagrama simplificado de fluxos de materiais de crescimento e metabolismo das culturas de células animais.....	pag.21
FIGURA 2	Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato.....	pag.22
FIGURA 3	Esquema de estrutura genérica de um aminoácido.....	pag.24
FIGURA 4	Visão geral do metabolismo de glutamina e glutamato em células de mamíferos.....	pag.26
FIGURA 5	Crescimento de células em cultura estática em T-Frasco 75 cm ² com meio de cultura DMEM/IMDM com SFB e Hybridoma SFM sem SFB.....	pag.37
FIGURA 6	Aspecto morfológico das células BHK21 durante a contagem de amostras em hemocítômetro.....	pag.38
FIGURA 7	Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em frasco <i>spinner</i> de 100 ml com 50 ml de volume de trabalho.....	pag.40
FIGURA 8	Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em frasco <i>spinner</i> de 100 ml com 50 ml de volume de trabalho comparativo do cultivo com meio Hybridoma SFM com Pluronic e sem Pluronic.....	pag.41
FIGURA 9	Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em frasco <i>spinner</i> de 100 ml com 50 ml de volume de trabalho comparativo do cultivo com meio Hybridoma SFM com Pluronic e meio DMEM/IMDM com Pluronic.....	pag.43
FIGURA 10	Monitoramento das variáveis ao longo do processo, sistema IRIS.....	pag.43
FIGURA 11	Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em Biorreator de tanque agitado.....	pag.46
FIGURA 12	Concentração de substrato e metabólitos ao longo do cultivo em biorreator de tanque agitado.....	pag.47
FIGURA 13	Velocidade de consumo de nutrientes e formação de metabólitos na fase exponencial.....	pag.51
FIGURA 14	Comparativo do desempenho das células BHK21-C13 entre os meios DMEM/IMDM 5% SFB e meio HYBRIDOMA SFM.....	pag.52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Relação dos componentes de meio/Litro.....	pag.31
TABELA 2	Resultados estatísticos para cultivo em frasco-T 75cm ² estático.....	pag.36
TABELA 3	Resultados estatísticos para cultivo em frasco spinner 100ml.....	pag 39
TABELA 4	Resultados estatísticos para cultivo em frasco <i>spinner</i> 100ml, avaliação do pluronic.....	pag 41
TABELA 5	Resultados estatísticos para cultivo em frasco <i>spinner</i> 100ml, avaliação dos meios DMEM/IMDM e Hybridoma SFM com adição de Pluronic.....	pag.42
TABELA 6	Resultados estatísticos para cultivo em biorreator de tanque agitado.....	pag.44
TABELA 7	Valores obtidos pelas equações de 1 a 5 em função do tempo de cultivo na fase de crescimento exponencial.....	pag.50
TABELA 8	Tabela com os componentes, concentração e preço para cada formulação.....	pag.52

LISTA DE ABREVIATURAS

μ_{MAX}	=	Velocidade específica máxima de crescimento celular
X_{MAX}	=	Concentração celular máxima
BHK	=	Baby Hamster Kidney
CHO	=	Chinese hamster ovary
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
IMDM	=	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
L	=	Litro
LDH	=	Lactato desidrogenase
mL	=	Mililitro
mM	=	Milimolar
NAD	=	Nicotina adenina dinucleotídeo
NADH	=	Nicotina adenina dinucleotídeo H^+
PF	=	Protein Free
rCHO	=	Chinese hamster ovary recombinant
SFB	=	Soro Fetal Bovino
SFM	=	Serum Free Media
TCA	=	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	pag. 12
1.1	Características de células de mamíferos.....	pag. 13
1.2	Linhagem de Células BHK-21 C13(<i>Baby Hamster Kidney</i>)	pag. 15
1.3	Meios de cultura para células de mamíferos.....	pag. 15
1.4	Complexidades das culturas de células de mamíferos.....	pag. 19
1.5	Principais orientações para a obtenção de bancos de células.	pag. 20
1.6	Metabolismo de células de mamíferos.....	pag. 20
1.7	Glicose.....	pag. 22
1.8	Aminoácidos.....	pag. 23
1.9	Glutamina.....	pag. 25
2	JUSTIFICATIVA.....	pag. 28
3	OBJETIVOS.....	pag. 29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	pag. 30
4.1	Linhagem celular.....	pag. 30
4.2	Meios de cultura.....	pag. 30
4.3	Criopreservação das células BHK21-C13.....	pag. 32
4.4	Cultura em garrafas de cultivo 25cm ² e 75cm ²	pag. 32
4.5	Cultura em frasco <i>spinner</i> de 100mL com 50mL vol. Trabalho	pag. 32
4.6	Cultura em biorreator de tanque agitado.....	pag. 33
4.7	Tratamento analítico dos dados.....	pag. 33
4.8	Equações utilizadas.....	pag. 34
4.9	Análise estatística dos dados.....	pag. 35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	pag. 36
5.1	Cultura estática em suspensão utilizando garrafa 75cm ²	pag. 36
5.2	Cultura celular em suspensão em frasco <i>spinner</i>	pag. 38
5.3	Cultura em suspensão com biorreator.....	pag. 43
5.4	Custo de produção para células BHK-21C13.....	pag. 52
6	CONCLUSÕES.....	pag. 54
7	REFERÊNCIAS.....	pag. 55

1. INTRODUÇÃO

A cultura de células animais se iniciou como uma mera coletânea de procedimentos artesanais para isolar e manter viáveis, por alguns dias, células provenientes de órgãos de diversas espécies de animais, tendo se transformado em uma tecnologia moderna, baseada em princípios científicos e de engenharia. Hoje, o cultivo de células animais só é possível pela utilização de meios de cultura desenvolvidos adequadamente (SPIER, 2000)

A introdução da técnica de cultivo de células animais *in vitro* se deu no início do século XX, com o trabalho de Ross Herisson, publicado em 1910, que tentava esclarecer a origem das fibras nervosas utilizando a técnica de gota suspensa. Para esta finalidade, foi empregada a linfa de rã. Ao demonstrar que as fibras nervosas se originavam do crescimento da própria célula nervosa, Herisson também confirmou que a célula é uma unidade de desenvolvimento primário em organismos multicelulares (WITKOWSKI, 1979).

A compreensão de metodologias de crescimento de células fora do organismo, ou seja, em cultura de células, tem demonstrado ser uma das mais valiosas aquisições técnicas, com aplicação no desenvolvimento de novas modalidades de fármacos. A técnica desenvolvida por Harrison foi seguida por vários outros pesquisadores da área, inclusive por Montrose Burrows, colaborador de Alexis Carrel, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1912, sendo considerado precursor dos transplantes de órgãos e das cirurgias vasculares (WITKOWSKI, 1979; REBELLO, 2014).

Graças a essa transformação, atualmente o cultivo de células animais é utilizado com êxito para produção de vacinas e glicoproteínas terapêuticas recombinantes. As aplicações do cultivo de células animais estendem-se a novos e fascinantes campos, como o de transplante de órgãos, as terapias celulares e gênicas, a toxicologia e fisiologia *in vitro*, a produção de biopesticidas, os dispositivos bioeletromecânicos e a nanobiotecnologia (RAMIREZ *et al*, 2007; CHEN, 2016).

A importância do cultivo de células animais reflete-se no fato de que, entre os mais de 500 produtos biofarmacêuticos que se encontravam em ensaios clínicos até 2010, cerca da metade foi produzida por essa tecnologia. Acrescentam-se a isso, os produtos derivados de células animais que, na contemporaneidade, representam um

mercado de dezenas de bilhões de dólares anuais, com taxas de crescimento significativas. Além do altíssimo valor econômico, há o impacto de tais produtos na melhoria da qualidade de vida e da saúde humana (MORAES *et al*, 2007; VISIONGAIN, 2012). Ao se incorporar tecnologia ao processo já consolidado, é possível obter-se ganho de qualidade e produtividade, implementando-se alternativas para novas descobertas.

1.1 Características de células de mamíferos

Em geral, as células de mamíferos relevantes para o processo industrial podem ser divididas em grupos:

a) Células primárias - isoladas a partir de um tecido e depois mantidas em cultura (cultura primária).

b) Linhagens celulares diploides; célula que contém duas cópias de cada cromossoma, um conjunto de cromossomos é herdado da mãe do indivíduo, enquanto o segundo é herdado do pai.

c) Linhagens celulares contínuas - que tiveram sua origem a partir de cultura primária, mas, devido a algumas transformações, são capazes de se dividir e proliferar indefinidamente.

d) Hibridomas que são células obtidas através da fusão de plasmócitos e células tumorais (mielomas), sendo capazes de expressar anticorpos monoclonais

Na cultura primária, o processo se inicia a partir da obtenção de amostras de tecidos diretamente de um órgão animal, seguida por dissociação mecânica e/ou digestão enzimática (colagenase), a fim de obter uma suspensão de células únicas (BROWNE, AL-RUBEAI, 2007)

As subculturas destas células são a origem das culturas chamadas secundárias, pois parte dessas células pode ser armazenada através do congelamento, após a adição de criopreservantes (por exemplo: dimetil sulfoxido - DMSO). A cultura primária pode ser subcultivada por diversas vezes; no entanto, possui número de duplicações (mitoses) máximas entre 50 e 100 vezes, quando a célula, por sua vez, deixa de crescer para entrar em apoptose (também chamada de morte programada) (DOYLE, 1994; MOLINARO, 2010). A capacidade de crescimento finito é uma característica de todas as células derivadas de tecidos normais de

mamíferos, as quais são consideradas normais quando demonstram um determinado conjunto de características, tais como: a) número específico de cromossomos (ou seja, 46 cromossomos para as células humanas), com qual é demonstrado que nenhum dano grave ocorreu em nível de cromossomo; b) aderência, as células necessitam de uma superfície para se anexar (ancoragem dependente) e crescer, com exceção de células derivadas do sangue, que são de ancoragem independente; c) número finito de divisões e consequente sobrevivência em cultura; d) não malignas, as células normais não são cancerosas; por exemplo, elas não causam tumores quando injetadas na espécie de origem (HAYFLICK, MOORHEAD, 1961).

Algumas células adquirem características de crescimento infinito e tal população é geralmente chamada linhagem contínua ou transformada. Estas células sofreram transformação, perdendo o controle do crescimento por contato. As células transformadas podem perder a característica de cultivo quando aderidas a uma superfície e, portanto, são capazes de se adaptar ao crescimento em suspensão. Estas transformações por vezes também se refletem nas características cromossômicas, alterando o genótipo das células, sendo chamadas de aneuploides. As células transformadas podem ser cultivadas em meios relativamente simples, sem adição de fatores de crescimento de alto custo. Desta forma, o que inicialmente foi identificado por acaso, hoje consiste em técnicas para transformação celular e a sua “imortalização”, como, por exemplo, o tratamento com substâncias mutagênicas ou com vírus (BUTLER, 2005).

A transformação *in vitro* nem sempre gera células que se dividem permanentemente; por outro lado, todas as células que foram isoladas de tumores (por exemplo: HeLa, Namalwa) podem ser mantidas em uma cultura permanentemente. As linhagens ou as cepas celulares podem se propagar em monocamadas aderentes ou em suspensão. Em monocamada, as células aderem ao suporte (polímeros, por exemplo) e se proliferam, sendo classificadas, quanto à forma de crescimento, como ancoragem dependente. A maioria das culturas de células normais cresce em monocamada, porém células hematopoiéticas, linhagens de células transformadas ou tumorais são exemplos de culturas em suspensão que podem sobreviver e proliferar sem aderir ao suporte, ancoragem independente (BUTLER, 2005; KIM, 2012).

1.2 Linhagem de células BHK-21C13(*Baby Hamster Kidney*)

A linhagem progenitora de células BHK-21C-13 foi obtida a partir de rins de hamster neonato através de transformação induzida por poliovírus, por Ian Macpherson e Michael Stoker em 1962. Utilizações específicas das células BHK-21 são encontradas principalmente em vacinas virais veterinária (febre aftosa e vírus da raiva), e recentemente em proteínas terapêuticas recombinantes humanas tais como Fator VIII (KALLEL *et al.*, 2002). Microcarregadores de apoio (pseudossuspensão) e sistemas de cultura de células em suspensão, têm sido explorados para esta linha celular, quando é desejado o *scale-up* de bioprocessos, devido às limitações de cultura em monocamada em grande escala (PERRIN *et al.*, 1995; BUTLER, 2005).

No entanto, microcarregadores aumentam o custo do processo e exigem medidas de otimização extras durante o desenvolvimento como o tipo de microcarregador e a concentração. Para ultrapassar estas desvantagens, as linhas de células BHK-21C13, foram adaptadas para crescer como células simples em suspensão. Assim, as densidades celulares mais elevadas, e as produtividades volumétricas e concomitante podem ser conseguidas, bem como a escalabilidade do processo de fabricação torna-se mais fácil (SILVA *et al.*, 2008).

Guskey e Jenkin (1975), adaptaram as células BHK-21C13 em suspensão em *shaker*, utilizando meio Waymouth 752/1 e infectaram com vírus da encefalite japonesa. Kallel e colaboradores (2002), adaptaram as células BHK-21C13 em dois tipos de meio de cultura sem SFB e três meios livres de proteína animal. A estratégia utilizada foi a redução gradual da concentração de SFB. Os autores relataram a formação de agregados celulares quando as células já estavam adaptadas aos meios sem SFB. As células BHK-21C13 de modo geral se adaptam bem em meios quimicamente definidos sem o SFB o que viabiliza ganho de escala em processo de produção de proteínas recombinantes ou de produção de vírus utilizando sistema de cultivo em suspensão, com agitação e escalonamento, desde frascos *spinner* até biorreatores de tanque agitado (CRUZ *et al.*, 1998).

1.3 Meios de cultura para células de mamíferos

Meios de cultura são preparações sólidas, líquidas ou semissólidas que contêm todos os nutrientes necessários para o crescimento da célula *in vitro*, os

quais são utilizados com a finalidade de cultivar e manter as células viáveis em laboratório, sob a forma de culturas puras (KARP, 2005)

Os primeiros cultivos de células *in vitro* foram executados com fluidos corpóreos tais como a plasma sanguíneo. Com a propagação de linhagens celulares, a procura por um meio de maior consistência e qualidade levou à introdução de meios quimicamente definidos, com base em análises de bioquímica nutricional de fluidos corporais. O meio Eagle (EAGLE, 1955), posteriormente, o meio de Eagle mínimo essencial MEM (EAGLE, 1959) tem como base uma mistura de aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais complementada com soro de bezerros, de humanos ou de cavalos. O seu uso permitiu aos cientistas cultivar ampla variedade de células sob condições experimentais definidas. Ainda hoje é utilizado o meio desenvolvido por Eagle como meio básico para cultura de células animais. (FRESHNEY, 2005).

Com as novas linhagens celulares, tornou-se necessário o desenvolvimento de novas formulações de meios de cultura, tais como: Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM), Ham F12 e Roswell Park Memorial Institute (RPMI) entre outros. Os progressos na compreensão do metabolismo celular e dos fatores necessários para o crescimento permitiram, também, o desenvolvimento de várias formulações livres de soro (FRESHNEY, 2010). O desenvolvimento com células em meios *sérum-free* deve atender a uma série de critérios, entre eles: a) o grau de definição química que pode ser: i) livres de soro (SF), ii) livre de componente de origem animal (ADCF), iii) quimicamente definido (CD), iv) livre de proteína (PF); b) a espécie doadora de célula; c) o órgão ou o tecido de origem; d) o tipo de célula (epitelial, endotelial, neural, fibroblástica e linfoblástica). Estes critérios serão essenciais para escolha do meio de cultivo, que pode ser: meio basal; suplementos para meios e meios de substituição (BRUNNER *et al*, 2010).

Basicamente, um meio de cultura para células de mamíferos deve fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento e a formação de produto. Além disso, deve ter a capacidade de tamponar, a fim de estabilizar o pH (pH ótimo 7,0- 7,3) e fornecer osmolaridade adequada (aprox. 300 mOsm Kg⁻¹), evitando danos às membranas. A presença de sais é fundamental para fornecer íons ao metabolismo celular e manter a pressão osmótica dentro do intervalo desejado (BUTLER, 2005; SEN, 2016).

Existem um ou mais sistemas-tampão (tampão fosfato de sódio, HEPES e/ou bicarbonato) para a regulação do pH. Em alguns casos, a presença de um indicador de pH (vermelho de fenol) no meio auxilia na manutenção e no acompanhamento da cultura. O vermelho de fenol se torna laranja em pH 7,0; amarelo em pH abaixo de 6,5; rosa em pH 7,6; e roxo em pH 7,8, servindo, portanto, para a rápida indicação visual se o pH se encontra em faixa adequada ao crescimento (HAM; MCKEEHAN, 1979; BERLEC, STRUKELJ, 2013).

Na maioria das formulações, a glicose é utilizada como a principal fonte de carboidrato para obtenção de energia, bem como um precursor para a biossíntese. Carboidratos alternativos, como a frutose, também podem ser adicionados. Os aminoácidos são incluídos como um precursor para a síntese de proteínas. Considerando que, para a maioria dos aminoácidos, a concentração é de aproximadamente 0,1-0,2 mM/L, a glutamina é normalmente incluída em concentrações mais elevadas (2-4 mMol/L), a fim de atuar como um precursor para os intermediários do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). Além disso, o meio contém vitaminas, sais minerais e oligoelementos (HAM, MCKEEHAN, 1979).

Desde o início do seu desenvolvimento, os meios de cultura são suplementados com aproximadamente 5-10% de soro (por exemplo: soro fetal bovino ou soro de cavalo), a fim de fornecer fatores de crescimento específicos e para proteger as células contra o estresse causado pelo cisalhamento (PULLA *et al.*, 2016). As desvantagens do meio contendo soro são: composição indefinida, alto custo de obtenção, dificuldade de purificação do produto, variações entre os lotes e risco de contaminação por agentes adventícios, os quais não podem ser removidos por filtração, além do risco de transmissão de príons, relacionados à encefalopatia espongiforme bovina (MORAES *et al.*, 2007).

O soro pode ser substituído parcialmente pela adição de uma série de componentes auxiliares, derivados ou não de proteínas, sendo estas recombinantes ou não, como, por exemplo: transferrina, insulina, albumina ou, eventualmente, fibronectina, como fator de aderência. Futuramente, para a constituição de meios de cultivo quimicamente definido, se prevê substituir proteínas de origem animal por sais, ou por complexos férricos, por IGF-1 (*insulin like grow factor I*), -por concentrados quimicamente definidos de lipídeos, por precursores ou por outros

agentes como ácidos graxos, biotina, colina, glicerina, etanolamina, hormônios e vitaminas (LINK, 2004)

A principal dificuldade em adaptar células animais aos meios *sérum-free* recai em: 1º) diminuição da taxa de crescimento e produtividade ao empregar um meio sem suplementação de soro; 2º) aumento da sensibilidade ao estresse, em função do cisalhamento e, conseqüentemente, a necessidade de utilização de surfactantes como Pluronic F68; 3º) formulação com diferentes composições para diferentes linhagens celulares. Desta forma, a adaptação do crescimento ao meio sem soro é lenta e nem todas as células são facilmente adaptáveis (SINACORE, 2000; LINK, 2004).

No cultivo de células primárias, em pesquisa básica ou na produção de vacinas, é comum o uso de meios suplementados com soro. Para produção industrial, é essencial o estabelecimento de linhagens celular otimizadas em meio sem soro e também sem produtos de origem animal (exemplos: colágeno bovino, tripsina suína, etc.), quando possível os meios devem ser quimicamente definidos. Meios de cultura com formulações desenvolvidas para cada caso podem permitir densidades celulares de aproximadamente 5×10^6 ou mais de 10^7 células/mL e 3-5 g/L de produto (anticorpos monoclonais, glicoproteínas, biofármacos etc.) (WURM, 2004). Um exemplo da necessidade de otimização de meios de cultura é a produção de vírus para vacinas. Ela exige altas densidades celulares para a replicação viral eficiente. No entanto, após a inoculação, os nutrientes devem ser em quantidades suficientes para manter a viabilidade celular e os altos níveis de atividade metabólica que normalmente seguem a infecção viral (CRUZ *et al.*, 1999).

A escolha do método de otimização depende do produto, da linhagem celular e do processo. Métodos geralmente utilizados são: a) **Estudo de componentes**, é a abordagem clássica para o desenvolvimento de meios de cultura, envolve a realização de uma série de experimentos para determinar a “dose-resposta” de uma linhagem celular e a presença de vários componentes, adicionando-se um a um em diferentes quantidades; b) **Mistura de meios**, rapidamente gera novos meios, simplesmente misturando formulações já existentes. Após avaliar as novas formulações, realizam-se testes adicionais com os meios que obtiveram bom desempenho. É um método rápido, porém não fornece bom conhecimento sobre o

Comportamento metabólico da célula durante o processo; c) **Análise do metabolismo celular**, fornece informações importantes, através da análise das alterações do meio durante o processo de cultura. Ao comparar as concentrações iniciais dos componentes com as concentrações finais, se determina o consumo médio. Através de modelos matemáticos, pode-se descrever o processo quanto ao esgotamento de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos (MORAES *et al.*, 2007).

Outras abordagens para otimização de meio de cultura se direcionam para a observação do estado metabólico celular, através da análise de fluxo metabólico e/ou do perfil de expressão gênica. Na análise de fluxo metabólico, as principais reações bioquímicas são traduzidas em equações de balanço de massa envolvendo carbono e nitrogênio. Normalmente, somente as reações de catabolismo de carboidratos e aminoácidos são consideradas, assim como a produção de biomassa e produto (VAN DER VALK *et al.*, 2010).

Existem vários fatores que contribuem para a determinação da formulação “ideal” de nutrientes. Cada fator pode alterar quantitativamente ou qualitativamente a composição de nutrientes do meio. Um exemplo é que o meio adequado para a produção em sistema de batelada pode ser inibitório para a produção em um sistema de cultivo por batelada-alimentada ou contínuo de perfusão. Os nutrientes que potencializam a densidade celular ou a produtividade podem ser indesejáveis quando interferem nas etapas iniciais críticas da purificação. Por último, os fatores econômicos associados com o custo e a estabilidade de matérias-primas, a qualidade e estabilidade do produto e na utilização de espaço/tempo podem ser afetados por matérias-primas que são muito caras ou não disponíveis em quantidade suficiente para as necessidades em escala de produção industrial (CRUZ *et al.*, 1999).

1.4 Complexidades das culturas de células de mamíferos

A contaminação por micro-organismos é um dos maiores problemas para a cultura de células animais. Bactérias, micoplasmas, leveduras e fungos podem ser introduzidos através do operador, da atmosfera, das superfícies de trabalho, das soluções, dos equipamentos e de outras fontes. O uso da técnica asséptica correta pode fornecer uma barreira entre os micro-organismos presentes no meio ambiente e a cultura de células. Portanto, a técnica asséptica é a combinação de

procedimentos que reduzem a probabilidade de contaminação, sendo que todos os materiais que entram em contato direto com a cultura precisam ser esterilizados e a manipulação precisa ser realizada, não existindo exposição entre o cultivo celular e o meio ambiente contaminado (BUTLER, 2005).

A esterilização do meio utilizado no cultivo de células garante que os reagentes não sejam fontes de contaminantes. A esterilização por calor (autoclave a 121 °C) não é a opção para muitos meios, devido à destruição de componentes e biomoléculas necessários para o crescimento celular. O método de escolha para esterilização de meios de cultura de células e aditivos é a filtração por membrana de 0,22µm ou até mesmo em membranas de 0,1µm (BUTLER, 2005).

1.5 Principais orientações para a obtenção de bancos de células:

Obtenção e controle da célula “original”, a fonte de linhagem celular não modificada geneticamente, ou células e tecidos obtidos a partir de animais e humanos, necessita ter documentação apropriada e permitir rastreamento, a fim de garantir as características fundamentais para a cultura celular:

- Identidade: característica gênica das células.
- Pureza: livre de contaminação microbiológica.
- Estabilidade fenotípica e genotípica após o crescimento *in vitro*.

Prevenir a contaminação microbiana de células em cultivo de larga escala depende do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF). Antes da preparação do banco mestre e do banco de trabalho de células, todas as células recebidas de fontes reconhecidas devem passar por quarentena e serem testadas quanto à esterilidade (bactérias e fungos) e à ausência de micoplasmas. Diversas espécies do gênero micoplasma são contaminantes comuns de culturas de células de mamíferos. A infecção de culturas celulares por micoplasmas pode gerar diferentes efeitos na citogenética: depleção de nutrientes do meio de cultura, alteração das características do crescimento celular, inibição do metabolismo, interrupção da síntese do ácido nucleico, produção de aberrações cromossômicas, alterações da antigenicidade das membranas celulares e interferência na replicação do vírus (WANG, 2007).

1.6 Metabolismo de células de mamíferos

O conhecimento do metabolismo celular é necessário para aprimorar o desempenho dos processos de cultivo de células de mamíferos para a produção industrial de biofármacos. Tal conhecimento permite determinar quais são os principais substratos e metabólitos que devem ser monitorados e controlados no meio de cultivo para maximizar o crescimento e produtividade celular (CRUZ *et al*, 1999).

As linhagens celulares imortalizadas podem continuar em cultivo até que ocorra o consumo limitante de nutrientes ou o acúmulo de metabólitos tóxicos. Para a obtenção de energia, as células animais precisam de uma fonte de carboidrato (geralmente glicose) e de glutamina. Devido à transformação, as células em cultura apresentam metabolismo modificado em relação às células no organismo de origem. Assim, os níveis de consumo de glicose e glutamina são muito elevados, excedendo as necessidades celulares (AMABLE, BUTLER, 2008).

Nos bioprocessos baseados no cultivo de células de mamíferos, intervenções que proporcionem melhoramentos no metabolismo podem levar a um aumento no crescimento celular, na viabilidade e na produtividade, reduzindo os custos do processo (CHANDRA, 2016) (figura1).

Figura 1 - diagrama simplificado de fluxos de materiais de crescimento e metabolismo das culturas de células animais.

Segundo Cruz e colaboradores (2000), o acúmulo de amônio e lactato (principais produtos provenientes do metabolismo da glutamina e da glicose) tem como consequência a diminuição do crescimento, além de influenciar o metabolismo e a produtividade celular. Algumas estratégias para controlar o metabolismo e reduzir a formação destes metabólitos foram estudadas, tais como manter baixas concentrações de glicose e glutamina para obter o metabolismo celular energeticamente mais eficiente (CRUZ *et al.*, 1999) ou adaptar as células ao crescimento em meio com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, como galactose e glutamato (ALTAMIRANO, 2000).

1.7 Glicose

A glicose está presente na grande maioria dos meios de cultivo e é metabolizada, em geral, pela glicólise, formando piruvato, que é convertido em lactato ou acetil CoA (Figura 2). O acúmulo de lactato no meio mostra que o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) não funciona adequadamente *in vitro*, como ocorre no organismo vivo. O lactato pode ser inibitório em concentrações a partir de 20 mM (FRESHNEY, 2010).

Figura 2 - Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato. ADP - adenosina difosfato; ATP - adenosina trifosfato; NAD⁺ - nicotina adenina dinucleotídeo (oxidada); NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzida); NADP - nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada); NADPH - nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida); P - fosfato. Adaptado de ALTAMIRANO *et al.*

Miller e colaboradores. (1989) realizaram vários experimentos nos quais foram avaliadas diferentes concentrações de glicose no meio de cultivo. Foi constatado que, quando há aumento da concentração de glicose de 0,1 para 8,4 mM, sua velocidade específica de consumo aumenta 67%. Quando se utilizam concentrações menores de glicose, esta é metabolizada de forma mais eficiente e proporciona menores quantidades de lactato (ALTAMIRANO, 2007).

Cultivos de células BHK-21C13 com diferentes concentrações iniciais de glicose mostraram que, em maior concentração, a velocidade específica de consumo foi maior do que nos cultivos com menor concentração inicial de glicose. Nestes experimentos, observou-se que, quando há maior quantidade inicial do carboidrato, este é convertido a piruvato, que, por sua vez, é convertido a lactato e não é metabolizado pelo TCA. No entanto, quando a concentração inicial de glicose é menor, uma fração maior é convertida a piruvato e menos piruvato é convertido a lactato, sendo uma parte maior do piruvato direcionada ao TCA (CRUZ *et al.*, 1999; ALTAMIRANO, 2007).

O baixo fluxo de piruvato ao TCA pode ser explicado pelo decréscimo da atividade de algumas enzimas (piruvato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, piruvato carboxilase e enzima málica II) que leva à conversão do piruvato acumulado a lactato pelo aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase, que representa uma via alternativa de geração de energia em processos celulares (AMABLE, BUTLER, 2008).

A produção de lactato leva a alterações no pH do meio de cultivo, afetando o crescimento celular devido ao aumento na osmolaridade do meio e aos efeitos sobre o metabolismo. A produção de lactato também afeta a formação de produto (KONAKOVSKY, VIKTOR, 2016). Foram observados efeitos negativos sobre a produtividade celular para concentrações de lactato acima de 20 mM. Sendo assim, os processos de cultivo celular devem ter o pH controlado afim de evitar o efeito negativo da acidificação do meio proveniente da produção de lactato (ALTAMIRANO, 2007).

1.8 Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades básicas das proteínas. Todas as proteínas são construídas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos com apenas algumas exceções. Cada aminoácido é constituído por um átomo central de carbono

ligado a um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral diferenciada. Dentre estes aminoácidos, existem 20 tipos de cadeias laterais que variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio, caráter hidrófobo e reatividade química (BERG *et al.*,2008; SALAZAR *et al.*,2016) (figura 3).

Figura 3- Esquema de estrutura genérica de um aminoácido.

No cultivo de células, os aminoácidos são necessários para a síntese de proteínas, nucleotídeos e lipídeos, além de serem utilizados como fonte de energia para o crescimento das células de mamíferos (ALTAMIRANO, 2007). Assim, os aminoácidos podem ter diferentes destinos metabólicos, sendo precursores para a produção de proteínas ou fontes de carbono e nitrogênio (FRANĚK, SRÁMKOVA, 1997).

As células de mamíferos, diferentemente das células procariotas, não são capazes de sintetizar as cadeias de carbono ramificadas ou as estruturas na forma de anel presentes em alguns aminoácidos. Estes aminoácidos são ditos essenciais, enquanto os outros são não essenciais. Os aminoácidos classificados como essenciais são fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e valina. Os aminoácidos não essenciais são alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glicina, glutamato, glutamina, prolina, serina e tirosina (BERG, *et al.*, 2008). No entanto, esta classificação pode variar em função da disponibilidade de aminoácidos em cada cultivo celular

As vias de síntese dos aminoácidos não essenciais são consideradas simples. Na síntese da maioria dos aminoácidos, ocorre uma reação de transaminação. A glutamato desidrogenase catalisa a aminação redutora do α -cetoglutarato a glutamato. Alanina e aspartato são sintetizados por transaminação de piruvato e oxaloacetato, respectivamente. A glutamina é sintetizada a partir de glutamato e NH_4^+ , sendo a asparagina sintetizada de forma semelhante. Prolina e arginina são derivadas do glutamato. A serina é formada a partir do 3-fosfoglicerato e é precursora de glicina e cisteína. A tirosina é sintetizada por hidroxilação da fenilalanina. As vias de biossíntese de aminoácidos essenciais são mais complexas (BERG *et al*, 2008).

No cultivo de células de mamíferos, alguns aminoácidos são consumidos muito rapidamente, como é o caso de valina, isoleucina, leucina, lisina e cisteína. A cisteína tem papel importante na conformação das proteínas e em sua atividade biológica, unindo as cadeias peptídicas através de pontes dissulfeto. Outros aminoácidos são consumidos em proporções menores: treonina, arginina, fenilalanina, serina, histidina, metionina e glicina (ALTAMIRANO, 2007).

Há outros aminoácidos que podem ser produzidos ou secretados pelas células: alanina, prolina, aspartato, asparagina e glutamato. A alanina é produzida em grandes quantidades. Esta alta produção de alanina no cultivo se relaciona com o alto metabolismo da glutamina, visto que até 40% da glutamina consumida pode ser dirigida para a formação de alanina como produto final (ALTAMIRANO, 2007).

A prolina é sintetizada diretamente em decorrência do acúmulo intracelular do glutamato, enquanto que a asparagina é formada pela amidação do aspartato pela via da asparagina sintetase. Geralmente, o aumento da concentração de glutamato no meio de cultivo ocorre quando o crescimento celular estaciona e, como consequência, o acúmulo intracelular de glutamato não pode ser processado mediante outras reações metabólicas (ALTAMIRANO, 2007).

1.9 Glutamina

A glutamina é a principal fonte de energia, carbono e nitrogênio para células de mamíferos (AMABLE, BUTLER, 2008). Todas as células de mamíferos utilizam, além da glicose, L-glutamina como fonte de energia proveniente do carbono. A glutamina é também a principal fonte de geração de amônio, que pode chegar a níveis de concentração inibitórios no meio de cultivo para o crescimento celular. Em

geral, o amônio alcança níveis deletérios entre aproximadamente 2 a 4 mM. Além de seu importante papel como fonte de energia, a glutamina é requerida como fonte de nitrogênio na síntese de pirimidinas, purinas, açúcares aminados, NAD e asparagina (ALTAMIRANO, 2007) (figura 4).

Figura 4 - Visão geral do metabolismo de glutamina e glutamato em células de mamífero.

A glutamina pode sofrer degradação espontânea a ácido pirrolidina carboxílico e amônio. A taxa de degradação aumenta com a temperatura: a 37°C, aproximadamente 20% da glutamina é convertida depois de 2 dias, enquanto que, a 4°C, menos de 20% é degradada, mesmo depois de 65 dias. O TCA, dentre outras funções no metabolismo central, fornece diversos precursores empregados em rotas anabólicas e provê a maior parte da energia metabólica. O piruvato é a ligação entre o TCA e a glicólise, sendo transportado do citosol até a mitocôndria para ser, então, transformado em acetil coenzima A por ação da piruvato desidrogenase (ALTAMIRANO, 2007).

Quando a glutamina está em alta concentração no meio de cultivo, há uso ineficiente desta e acúmulo de amônio. Experimentos realizados com uma linhagem de hibridoma mostraram aumento da velocidade específica de consumo de glutamina quando a concentração de glutamina empregada foi maior na alimentação de um cultivo contínuo. Resultados similares foram obtidos para células BHK-21C13 (CRUZ *et al*, 1999; MILLER, *et al*, 1989).

Quando os níveis de glicose são limitantes e a glutamina se encontra em excesso, o metabolismo celular é capaz de adaptar-se a esta situação de escassez energética e biossintética, através do aumento da velocidade de consumo de glutamina. Com isso, há aumento da produção de amônio e do consumo de oxigênio (BHANU, 2016). Da mesma forma, em condições de limitação de glutamina, há aumento do consumo de glicose. No entanto, estes comportamentos variam para diferentes linhagens celulares (MILLER *et al*, 1989).

Em relação aos consumos integrados de glicose e glutamina, pode-se afirmar que o metabolismo celular apresenta certa flexibilidade, o que permite que haja uma adaptação de acordo com as condições de cultivo encontradas. Estas observações refletem o que ocorre, em especial, nos cultivos em batelada e em batelada alimentada, pois as células são submetidas a variações nas concentrações de glicose e glutamina e nas velocidades de consumo destes substratos (ALTAMIRANO, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

A busca de alternativas para a substituição do meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, por um meio quimicamente definido, bem como a adaptação de linhagens celulares para cultivo em suspensão tem sido amplamente difundida entre pesquisadores e produtores de vacinas e biofármacos.

O presente trabalho abordou a viabilidade do cultivo de células BHK-21C13 em um meio comercial quimicamente definido, comparando o desempenho das células BHK-21C13 entre o meio DMEM/IMDM com 5% SFB e o meio Hybridoma SFM. A relevância de tal substituição contempla as recomendações das agências regulatórias, para a diminuição de proteína animal em produtos derivados de bioprocessos, e também possibilitaria a maximização, com diminuição de custo de produção e ganho de qualidade para um produto de interesse.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal a avaliação do desempenho das células BHK-21C13 em duas diferentes formulações de meios de cultura. A primeira uma mistura do meio comercial DMEM e IMDM suplementado com 5% de SFB e 4mM de L-glutamina e a segunda, o meio comercial quimicamente definido, HYBRIDOMA SFM® que vem suplementado com L-glutamina, insulina e transferrina recombinante.

Objetivos específicos

- Caracterização e comparação da cinética de crescimento e do metabolismo celular da linhagem adaptada.
- Análise estatística dos resultados obtidos.
- Comparação entre os dois meios de cultura em escalonamento até 1,5L através de ensaios com cultivo estático e agitado.
- Comparação da viabilidade econômica em relação à produtividade de células por litro de meio de cultivo, entre os meios de cultura testados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem celular

Células BHK-21-C13 (linhas celulares Sigma-Aldrich ECACC, Lyon, França) adaptadas à cultura de suspensão única, foram gentilmente cedida pelo Dr. Renaud Wagner da Ecole Supérieure Biotechnologie de Strasbourg (França).

4.2 Meio de cultura

Meio Referência (Meio com Soro Fetal Bovino SFB)

A formulação do meio de cultura com SFB tem seguinte composição: 45,5% de meio Dulbecco Modificado por Iscove Médio com glutamina e vermelho de fenol (IMDM, número de catálogo 12200-036, Gibco, Grand Island, NY, EUA); 45,5% do meio Dulbecco Modified Eagle Médium com teor elevado de glucose (DMEM, número de catálogo 12100-046, Gibco); 5% de soro fetal de bovino inativado pelo calor (número de catálogo 10082-147, Gibco); 2% de Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de solução aquosa e 2% glutamina 4 mM (Sigma-Aldrich) de solução aquosa (Fernández Nuñez et al. 2013). A composição definida de cada um dos meios utilizados pode ser observada na tabela 1.

Meio Hybridoma SFM® (Meio sem Soro Fetal Bovino SFB)

Utilizamos o meio Hybridoma SFM® com L-glutamina, insulina e transferrina recombinante (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), número de CAT 12045-076. A formulação do meio Hybridoma SFM® é mantida sob sigilo pelo fabricante. Este meio é credenciado e está autorizado para uso pela FDA, e pode ser empregado para produção de anticorpos monoclonais, cultivo de hibridomas ou de outras células animais. O produtor fornece um certificado de autorização para referenciar ao Drug Master File Tipo II (DMF). É uma formulação isenta de soro fetal bovino e com baixo teor de proteína, permitindo uma fácil purificação de uma proteína de interesse. A concentração de proteína total na formulação segundo o fabricante, é de 20 ng/mL.

Relação dos componentes dos meios

COMPONENTES	DMEM (mg/L)	IMDM (mg/L)	Meio REF. (mg/L)
Glicine	30.0	30.0	30.0
L-Alanine	25.0		12,5
L-Arginine hydrochloride	84.0	84.0	84,0
L-Asparagine (freebase)	25.0		12.5
L-Aspartic acid	30.0		15.0
L-Cystine 2HCl	91.4	63.0	77,2
L-Glutamic Acid	75.0		37.5
L-Glutamine	584.0	584.0	838.0
L-Histidine hydrochloride-H2O	42.0	42.0	42.0
L-Isoleucine	105.0	105.0	105.0
L-Leucine	105.0	105.0	105.0
L-Lysine hydrochloride	146.0	146.0	146.0
L-Methionine	30.0	30.0	30.0
L-Phenylalanine	66.0	66.0	66.0
L-Proline	40.0		20.0
L-Serine	42.0	42.0	42.0
L-Threonine	95.0	95.0	95.0
L-Tryptophan	16.0	16.0	16.0
L-Tyrosine disodium salt	104.0	104.0	104.0
L-Valine	94.0	94.0	94.0
Vitaminas			
Biotin	0.013		0.006
Choline chloride	4.0	4.0	4.0
D-Calcium pantothenate	4.0	4.0	4.0
Folic Acid	4.0	4.0	4.0
Niacinamide	4.0	4.0	4.0
Pyridoxal hydrochloride	4.0	4.0	4.0
Riboflavin	0.4	0.4	0.4
Thiamine hydrochloride	4.0	4.0	4.0
Vitamin B12	0.013		0.006
Sais Inorgânicos			
i-Inositol	7.2	7.2	7.2
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	165.0	111.0	138.0
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)		404.0	202.0
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	97.67	120.0	108.8
Potassium Chloride (KCl)	330.0	75.0	202.5
Potassium Nitrate (KNO ₃)	0.076		0.038
Sodium Chloride (NaCl)	4500.0	58.0	2279.0
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	125.0	138.0	131.5
Sodium Selenite (Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O)	0.0173		0.0086
Outros componentes			
D-Glucose (Dextrose)	4500.0	180.0	2340.0
HEPES	5958.0		2979.0
Phenol Red	15.0	15.0	7.5
Sodium Pyruvate	110.0		55.0

Tabela 1 - Composição dos meios DMEM e IMDM segundo o fabricante GIBCO^T

4.3 Criopreservação das células BHK21-C13

A solução para congelamento foi formulada com 45% de meio de cultura com SFB recém preparado, 45% de solução com células em meio condicionado (final da fase de crescimento) e 10% de dimetil sulfoxido DMSO (número de catálogo D 2650, Sigma-Aldrich). A concentração de células na mistura de congelamento foi de 2×10^6 células ml^{-1} . As células foram acondicionadas em tubos de criopreservação com 2mL cada (Corning Incorporated, Monterrey, México). O protocolo de congelamento teve os seguintes procedimentos: as células foram mantidas a -30°C (349-FV congelador plasma, Fanem, Brasil) durante 12h; em seguida foram transferidas para um freezer -80°C (Revco LUT 1386-3- D39, Kendro Laboratory Products, Newtown, CT, EUA) onde permaneceram também por 12h e, finalmente, foram mantidas em tanque de nitrogênio líquido a -196°C .

4.4 Cultura em garrafas de cultivo 25 e 75 cm^2

Dois mililitros da celular BHK-21-S13 adaptadas, criopreservados foram descongelados de forma rápida em banho-maria com água a 37°C ; em seguida todo o volume do criotubo foi transferido para uma garrafa de cultivo $\text{T}25\text{cm}^2$ (TPP, Trasadingen, Suíça) sendo acrescentados mais 8 ml de meio de cultura, ora com SFB, ora sem SFB. A garrafa foi encubada na posição vertical, de modo a reduzir a adesão celular à superfície, e como consequência, evitar o tratamento das células com enzima (tripsina). Após 48h de cultivo, uma aliquota da suspensão celular foi obtida na concentração de $2,5 \times 10^5$ células ml^{-1} , para ser utilizada como inóculo para uma garrafa de 75 cm^2 (TPP) também na posição vertical, com volume de trabalho de 30mL. Foram retiradas amostras de 0,5mL a cada 24h, para verificação da concentração máxima de células viáveis (X_{max}), da taxa de crescimento específico (μ_{max}) e da viabilidade celular para a cultura estática. Cada condição foi realizada em triplicata e monitorada durante 48hs.

4.5 Cultura em frasco *spinner* 100ml, com 50ml volume de trabalho.

Na fase de cultivo em frascos *spinners* (100 ml, Bélico Glass Inc., Vineland, NJ, EUA), 5 mL de cultivo preparados em garrafas $\text{T}75\text{cm}^2$, a concentração de células foi de $1,7$ a $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} e foi utilizada como inóculo para o frasco

spinner com 50mL de volume de trabalho.. Para isto, a fim de concentrar as células e diminuir metabolitos tóxicos foi necessária a centrifugação das células provenientes do cultivo em garrafa de T75cm², a 750 X g durante 4 min (Sorvall Biofuge Primo R Centrífuga, Thermo Electron Corp., Alemanha), o volume do sobrenadante foi descartado. A velocidade de agitação no *spinner* foi de 40 rpm (agitador de quatro posições magnético, Sci Era, sistema de acionamento Quad, Bélico Biotechnology, Vineland, NJ, EUA). Todos os experimentos foram realizados a 37°C e 5% de CO₂ (incubador Thermoforma 3110, Marietta, OH, EUA). Amostras de 0,5 mL foram retiradas a cada 24h para verificação da concentração máxima viável de células (X_{max}), da taxa de crescimento específico (μ_{max}) e da viabilidade celular para a cultura em agitação. Cada condição foi realizada em triplicata e monitorada durante 96h.

4.6 Cultura em biorreator de tanque agitado

Ensaio em sistema fechado em biorreator foram realizados em equipamento de 5 L Minifors biorreactor (Infors -HT, Basileia, Suíça) com um volume de trabalho de 1,5 L, a 37 °C e agitação de 80 rpm. A concentração inicial de células era de $1,4 \times 10^5$ células ml⁻¹. Os ensaios foram mantidos com controle automático de aeração de oxigênio e ar comprimido e controle de pH por CO₂. Os parâmetros de oxigênio dissolvido foram mantidos em 50% e os de pH em 7,2, durante o processo de cultivo celular que durou aproximadamente 190 horas. O inóculo para o biorreactor foi preparado a partir de culturas em frascos *spinner* na fase final de crescimento. Amostras de 5 mL foram coletadas a cada 24h ao longo do cultivo, para estudo da cinética de crescimento e viabilidade celular, do consumo de nutrientes e da formação de metabólitos

4.7 Tratamento analítico dos dados

A concentração de células foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer (Precicolor HBG, Giessen-Lützellinden, Alemanha) empregado uma diluição adequada da amostra em tampão fosfato salina (PBS). As células viáveis foram quantificadas em paralelo utilizando o método de exclusão por azul de trypan (Augusto et al., 2010).

Foram realizados estudos das taxas cinéticas, da concentração celular máxima ($X_{\max}$), e da taxa de crescimento específico, ($\mu_{\max}$), calculada pela plotagem do logaritmo natural da concentração de células viáveis em função do tempo de duração da fase exponencial (Augusto et al. 2010). Para os estudos cinéticos em sistemas estáticos e agitados, foram coletadas amostras em momentos diferentes durante o processo; estas, por sua vez foram centrifugadas (Sorvall Biofuge Primo R Centrífuga, Thermo Electron Corp., Alemanha) a 750 X g durante 4 minutos e congeladas a -30 °C até a análise de nutrientes (glicose e L-glutamina) e de metabólitos (lactato e glutamato). As concentrações de L-glutamina, glicose, lactato e de glutamato a partir de amostras de sobrenadante foram medidas utilizando a reação de enzima acoplada e detecção eletroquímica, em um YSI 2700 Select Bioanalyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH, EUA).

4.8 Equações utilizadas

A taxa de crescimento específico foi determinada pela equação

$$1) \quad \mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dT}$$

O tempo de duplicação celular foi determinado pela equação

$$2) \quad t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Taxas de conversão de nutrientes em células e metabólitos, bem como produtividade e índice de crescimento foram determinados pelas equações

$$3) \quad Y_{x/gln} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X-X_0}{-(Gln-Gln_0)}$$

$$4) \quad Y_{x/glc} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X-X_0}{-(Glc-Glc_0)}$$

$$5) \quad Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Lac-Lac_0}{-(Glc-Glc_0)}$$

$$6) \quad Px = \frac{X_{\max} - X_i}{T_f}$$

$$7) \quad IC = \frac{X_{\max} - X_i}{X_i} \cdot 100$$

4.9 Análise estatística dos dados

A comparação de médias amostrais (análise de teste t de Student) e o cálculo de tempo duplicação foram realizados no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). O nível de significância estatística (α) foi de 0,05. Os outros tratamentos de dados gráficos foram realizados em Microsoft Excel (Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultura celular estática em suspensão utilizando frasco-T 75cm²

Os ensaios realizados em cultivo estático com frasco-T 75cm² para avaliar a influência do meio suplementado com e sem SFB, foram feitos em paralelo com cada formulação de meio de cultura, considerando $X_{\max}$ e $\mu_{\max}$. Os parâmetros: $X_{\max}$ ($P = 0,06091$, $\alpha = 0,05$, teste *t de Student*) e $\mu_{\max}$ ($P = 0,66003$, $\alpha = 0,05$, teste *t de Student*) não foram significativamente influenciados pelo meio de cultura em cultivo estático, A viabilidade das células em todos os momentos dos cultivos se manteve acima de 95%. A análise de tempo de duplicação apresentou diferença, sendo 15hs20min valores para meio DMEM/IMDM com 5% de SFB e 23hs20min para o meio HYBRIDOMA SFM sem SFB, como mostrado na Tabela 2.

Resultados estatísticos para cultivo em Frasco-T 75cm² estático.

Tempo (horas)	Media±DP 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ Meio com SFB	CV meio com soro (%)	Media±DP 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ Meio sem SFB	CV meio sem soro (%)	$X_{\max}$ 10 ⁶ cel ml ⁻¹	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Tempo de Duplicação (horas)
0	0,23±0,00	0,00	0,4±0,004	0,00	2,03±0,11 Com SFB	0,045±0,053 Com SFB	15,20 Com SFB
24	0,81±0,054	6,60	1,01±0,22	21,51			
48	2,03±0,11	5,35	1,72±0,017	9,77	1,72±0,17 Sem SFB	0,035±0,095 Sem SFB	23,20 Sem SFB

Tabela 2 - Concentração máxima celular ($X_{\max}$), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$). Desvio padrão DP; Soro Fetal Bovino SFB e CV Desvio Padrão Relativo ou coeficiente de variação.

As células BHK-21 foram capazes de crescer em ambos os meios testados. A maior densidade de células foi obtida em meio DMEM / IMDM com 5% de SFB. Nestas condições de cultura, a densidade celular foi de $2,03 \times 10^6$ e $1,72 \times 10^6$ células ml⁻¹, respectivamente. A taxa de crescimento específico máxima apresentou variação entre os cultivos 0,045 células h⁻¹ e 0,035 células h⁻¹ em DMEM/ IMDM com 5% de SFB e Hyibridoma SFM (Figura 5).

Figura 5- Crescimento de células em cultura estática em T-Frasco 75 cm² com meio de cultura DMEM/IMDM com SFB e (Hybridoma SFM) sem SFB.

Os valores obtidos estão próximos de resultados publicados por Nuñez e colaboradores (2016), que obtiveram média de $X_{\max} = 2,03 \times 10^6$ células ml⁻¹ para 72h de cultivo com meio DMEM / IMDM suplementado com 5% SFB em cultivo com frasco-T 75cm². Já Kallel e colaboradores (2002) demonstraram $X_{\max} = 1,41 \times 10^6$ células ml⁻¹, para cultivo com o meio *protein free*, HyQ PF CHO MPS em cultivo com frasco-T 25cm². Os autores trabalharam com a mesma linhagem celular.

Com base nos resultados obtidos nesse ensaio foram selecionados ambos os meios de cultura para se estudar o crescimento de células BHK21-C13 em cultivo com frasco *spinner* e biorreator de tanque agitado. A alta viabilidade das células BHK21-C13 durante todo o processo (acima de 90%), nos cultivos com os meios DMEM / IMDM com 5% SFB e Hybridoma SFM, aferida com a técnica de exclusão pelo azul tripan em hemocitômetro, comprova a boa adaptação dessa linhagem para cultivo em suspensão com meio de cultura sem soro fetal bovino, que produz resultados próximos aos obtidos em processo utilizando o meio de cultura suplementado com soro fetal bovino. É possível observar o aspecto morfológico das células na imagem ampliada em microscópio invertido (Figura 6).

Figura 6- Aspecto morfológico da célula BHK21 durante a contagem de amostras em hemocitômetro.

As células BHK21-C13 adaptadas para cultivo em suspensão, quando cultivadas em modo estático, tendem a apresentar agregados celulares. A falta de agitação faz com que as células se sedimentem no fundo do frasco-T, sobrepondo-se uma a outra. Esta condição dificulta a transferência de oxigênio e nutrientes no meio ambiente. O volume do meio trabalhado pode influenciar na taxa de concentração máxima alcançada. Por outro lado, não existe o problema de cisalhamento comum quando se trabalha com agitação (EDWARDS *et al.*, 1975; MOREIRA *et al.*, 1995).

5.2 Cultura celular em suspensão agitada utilizando frasco *spinner*.

Os ensaios de crescimento celular foram realizados em frasco *spinner* com capacidade total de 100ml com 50 mL de volume de trabalho, para determinar a influência do meio de cultura suplementado com e sem SFB, buscando-se a concentração celular máxima $X_{\max}$ e velocidade de crescimento $\mu_{\max}$. Em *spinner*, diferentemente da cultura estática as células são cultivadas com agitação controlada; no presente trabalho foi ajustada a velocidade de agitação de 40 rpm. Os parâmetros: $X_{\max}$ e $\mu_{\max}$ foram significativamente influenciados pelos meios de

cultura em agitação ($P = 0,00892$, $\alpha = 0,05$, t de Student para $X_{\max}$ e $P = 0,0272$, $\alpha = 0,05$, t de Student para $\mu_{\max}$). A viabilidade das células durante todo período de cultivo em ambos os meios de cultura ficou acima de 92%. As análises do parâmetro tempo de duplicação apresentaram assim grandes diferenças, mais de 7 horas. Sendo 16h26min valores para meio DMEM/IMEM com 5% de FBS e 23h28min para Hybridoma SMF sem SFB, mostrando que o meio com SFB apresentou duplicação celular em tempo mais curto. O meio de cultura teve influência no processo, como demonstrado na Tabela 3.

Resultados estatísticos para cultivo em frasco *spinner* 100ml

Tempo (horas)	Media $\pm$ DP 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ Meio com SFB	CV meio com soro (%)	Media $\pm$ SD 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ Meio sem SFB	CV meio sem soro (%)	$X_{\max}$ 10 ⁶ cel ml ⁻¹	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Tempo De Duplicação (horas)
0	0,25 $\pm$ 0,018	5,39	0,17 $\pm$ 0,008	5,15	5,12 $\pm$ 0,024 com SFB	0,0437 com SFB	16,26 com SFB
24	0,55 $\pm$ 0,028	2,56	0,23 $\pm$ 0,027	6,25			
48	2,44 $\pm$ 0,038	4,61	0,31 $\pm$ 0,037	4,11			
72	4,51 $\pm$ 0,028	5,44	0,98 $\pm$ 0,043	3,15	1,57 $\pm$ 0,160 sem SFB	0,0303 sem SFB	23,28 sem SFB
96	5,12 $\pm$ 0,025	5,77	1,57 $\pm$ 0,023	13,91			

Tabela 3 - Concentração máxima celular ($X_{\max}$), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$). Desvio padrão DP; SFB Soro Fetal Bovino e CV Desvio Padrão Relativo ou coeficiente de variação.

As células BHK-21 foram capazes de crescer em ambos os meios testados com agitação controlada. A maior densidade de células foi obtida em meio DMEM / IMDM com 5% de SFB. Nestas condições de cultura, a densidade celular foi de $5,12 \times 10^6$ e em Hybridoma SFM $1,57 \times 10^6$ células ml⁻¹, respectivamente. A taxa de crescimento específico máxima $\mu_{\max}$, apresentou variação entre os cultivos 0,04 células h⁻¹ em DMEM / IMDM com 5% de SFB e 0,03 células h⁻¹ em Hybridoma SFM. As culturas em suspensão na fase de preparação do inóculo são geralmente efetuadas em frascos *spinners* ou em biorreatores de pequeno volume, que são superiores aos frascos-T, devido à homogeneização da cultura celular, diminuindo

os gradientes de temperatura, de acesso aos nutrientes e toxicidade de metabólitos dentro do sistema com agitação, melhorando o transporte de nutrientes e a difusão gasosa. A velocidade de agitação e o volume útil são parâmetros críticos a serem otimizados (KLOTH, C et al, 2010). As células BHK21-C13 cultivadas em meio DMEM/IMDM suplementado com SFB apresentaram um valor maior para X_{max} , esta diferença pode ser justificada pela presença de PLURONIC F68 e do próprio SFB na formulação o que evita o estresse por cisalhamento. (Figura 7).

Figura 7- Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em frasco *spinner* de 100 ml, com 50 ml de volume de trabalho.

Foi feito um ensaio com as células BHK21C13, cultivadas com meio Hybridoma SFM suplementado com 2% de solução de pluronic (10%). O cultivo foi feito em triplicata para testar a influência da adição de pluronic no meio de cultura, a fim de minimizar os efeitos do cisalhamento ao longo do cultivo. O parâmetro $X_{máx}$ ($P = 0,0365$, $\alpha = 0,05$, t de Student) foi significativamente influenciado, enquanto o parâmetro $\mu_{máx}$ ($P = 0,1388$, $\alpha = 0,05$, t de Student) não foi significativamente influenciado pela adição de pluronic; houve diferença nas variâncias, o que traduz a forma de construção da curva de crescimento. A viabilidade das células em todo tempo de amostra do cultivo ficou acima de 92%. A análise do parâmetro tempo de duplicação foi de 29hs16min, mostrando que o meio Hybridoma SFM suplementado com pluronic apresentou duplicação celular em tempo maior, em relação ao cultivo

sem adição de pluronic, que apresentou tempo de duplicação de 23hs28min, como demonstrado na tabela 4.

Resultados estatísticos para cultivo em frasco *spinner* 100ml, avaliação do pluronic

Tempo (horas)	Media±DP 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ Hibridoma c/Plurônico	CV meio c/Plurônico (%)	Media±DP 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ Hibridoma s/Plurônico	CV meio s/Pluronic (%)	X _{max} 10 ⁶ cel ml ⁻¹	μ _{max} (h ⁻¹)	Tempo de Duplicação (horas)
0	0,25±0,009	0,0004	0,17±0,011	5,15			
24	0,49±0,017	14,7	0,23±0,009	24,37	4,28±0,08 c/Plurônico	0,024 c/Plurônoc	29,16 c/Plurônoc
48	1,84±0,030	0,0004	0,31±0,020	28,2			
72	3,43±0,044	8,28	0,98±0,043	37,19	1,57±0,081 s/Plurônico	0,026 s/Plurônico	26,24 s/Plurônico
96	4,28±0,024	3,89	1,57±0,081	17,66			

Tabela 4 - Concentração máxima celular (X_{max}), taxa de crescimento máxima (μ_{max}). Desvio padrão DP; CV Desvio Padrão Relativo ou o coeficiente de variação.

A velocidade máxima de crescimento μ_{máx} foi de 0,024 célula h⁻¹ para o meio suplementado com pluronic e de 0,026 célula h⁻¹, para o meio sem pluronic. a concentração máxima X_{max}, em 4,28 x10⁶ cel/mL, como apresentado na figura 8.

Figura 8- Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em frasco *spinner* de 100 ml com 50 ml de volume de trabalho comparativo do cultivo com meio Hybridoma SFM com Pluronic e sem Pluronic

Da mesma forma foi feito um ensaio comparativo entre cultivos com os meios DMEM/IMDM 5% SFB e Hybridoma SFM, ambos com adição de 2% de solução de pluronic (10%), considerando os valores de $X_{\max}$ e $\mu_{\max}$. O ensaio foi feito em triplicata e os valores dos parâmetros: $X_{\max}$ ($P = 0,696$, $\alpha = 0,05$, *t de Student*) e $\mu_{\max}$ ($P = 0,0566$, $\alpha = 0,05$, *t de Student*) não foram significativamente influenciados, segundo o teste estatístico *t*. A viabilidade das células em todo tempo de amostra do cultivo ficou acima de 98%. As análises do parâmetro tempo de duplicação foram de 34h49min, para o meio DMEM/IMDM 5% SFB e 33hs16min, para o meio Hybridoma SFM. O desempenho de ambos os meios ficaram muito próximos, conforme demonstrado na tabela 5.

Resultados estatísticos para cultivo em frasco *spinner* 100ml, avaliação de pluronic

Tempo (horas)	Media±DP 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ DMEM/IMDM c/Plurônico	CV meio DMEM/IMDM (%)	Media±SD 10 ⁶ cel.Ml ⁻¹ Hibridoma c/Plurônico	CV meio Hibridoma (%)	$X_{\max}$ 10 ⁶ cel ml ⁻¹	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Tempo de Duplicação (horas)
0	0,25±0,017	0,0004	0,25±0,002	0,0004			
24	0,55±0,023	14,74	0,49±0,027	0,44	5,12±0,2 DMEM+ Plurônico	0,02 DMEM+ Plurônico	34,49 DMEM+ Plurônico
48	2,44±0,034	0,0004	1,84±0,029	0,48			
72	4,51±0,027	8,28	3,43±0,023	0,99	4,28±0,08 Hibridoma + Plurônico	0,021 Hibridoma + Plurônico	33,16 Hibridoma + Plurônico
96	5,12±0,038	3,89	4,28±0,047	1,85			

Tabela 5- Concentração máxima celular ($X_{\max}$), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$). Desvio padrão DP; SFB Soro Fetal Bovino e CV Desvio Padrão Relativo ou o coeficiente de variação.

A velocidade máxima de crescimento $\mu_{\max}$ foi de 0,02 célula h⁻¹ para o meio DMEM/IMDM 5% SFB e de 0,021 célula h⁻¹, para o meio Hybridoma SFM. A adição de pluronic em ambos os meios de cultura teve influência no processo, mantendo o tempo de replicação da célula em torno de 30h e aumentando a concentração máxima ($X_{\max}$), em 4-5 x10⁶ cel/mL, como demonstrado na figura 9.

Figura 9- Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em frasco *spinner* de 100 ml com 50 ml de volume de trabalho comparativo do cultivo com meio Hybridoma SFM com Pluronic e meio DMEM/IMDM com Pluronic

5.3 Crescimento de células em suspensão com biorreator

Os ensaios de crescimento celular foram realizados em biorreator de bancada (Labfors Infors-HT, Basileia, Suíça), com dorna de 5.000 mL e volume de trabalho de 1500 mL. Neste biorreator, as variáveis programáveis são: agitação, temperatura e pH em oxigênio dissolvido. Todas as variáveis mantiveram-se constantes: agitação em 80 rpm, temperatura em 37 °C, pH 7,2 com ajuste automático e oxigênio com 50% de saturação controlado através de válvula de massa do gás dissolvido. O sistema foi alimentado com O₂, N₂, CO₂ e ar comprimido (figura 10).

Figura 10 – Monitoramento das variáveis ao longo do processo, sistema IRIS.

É possível observar que o O.D. se manteve em torno de 50% de concentração e houve perturbações ao longo do processo; no entanto pode se afirmar que as células não sofreram limitação por oxigênio e não foram expostas à uma alta concentração tóxica. O pH esteve em torno de 7,0 fluando entre 6,9 e 7,7 ao longo do cultivo. As variáveis, agitação e temperatura se mantiveram em 80rpm e 37°C.

Na análise estatística os parâmetros $X_{\max}$ ($P = 0,0512$, $\alpha = 0,05$, *t de Student*) e $\mu_{\max}$ ($P = 0,7417$, $\alpha = 0,05$, *t de Student*) não foram significativamente influenciados pelos meios de cultura em cultivo com agitação (tabela 6).

Resultados estatísticos para cultivo em biorreator de tanque agitado

Tempo (horas)	Media±DP 10 ⁶ cel.mL ⁻¹ Meio com SFB	CV meio com soro (%)	Media±DP 10 ⁶ cel.mL ⁻¹ Meio sem SFB	CV meio sem soro (%)	$X_{\max}$ 10 ⁶ cel mL ⁻¹	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Tempo de Duplicação (horas)
0	0,139±0,035	25,39	0,109±0,028	25,75			
5			0,128±0,029	22,87			
23			0,165±0,054	32,40			
32	0,145±0,034	23,60					
47			0,174±0,047	27,16			
48	0,199±0,044	22,09			4,77±0,862 com SFB	0,01831 com SFB	38,26 com SFB
53			0,221±0,079	35,62			
55	0,259±0,075	29,03					
71			0,398±0,069	17,47			
72	0,624±0,136	21,78					
76			0,594±0,111	18,62			
79	1,06±0,122	11,54					
95			1,15±0,142	12,37			
96	2,21±0,368	16,65					
101			1,54±0,286	18,62			
102	2,82±0,282	10,04					
119			3,58±0,720	20,11			
122	3,75±0,509	13,59			4,74±0,166 sem SFB	0,02533 sem SFB	27,36 sem SFB
143			4,74±0,166	35,10			
146	4,77±0,862	18,08					
167			2,75±0,593	21,56			
168	3,66±0,622	16,92					
192	1,49±0,488	32,77					

Tabela 6 - Concentração máxima celular ($X_{\max}$), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$). Desvio padrão DP; SFB Soro Fetal Bovino e CV Desvio Padrão Relativo ou o coeficiente de variação.

A viabilidade das células em ambos os meios de cultura permaneceu acima de 95% até o instante acima de 120 horas, quando se iniciou sua queda. As análises do parâmetro tempo de duplicação apresentaram diferença, sendo valores de 38h26min para o meio DMEM/IMEM com 5% de SFB e 27h36min para meio Hybridoma SFM, mostrando que o meio sem SFB rendeu duplicação celular em tempo mais curto. Embora pela análise estatística o meio de cultura não tivesse influenciado no processo, houve diferença de velocidade de crescimento (μ), entre os meios testados, permanecendo próximos os tempos de duplicação das células quando utilizamos meios de cultura sem SFB. A concentração celular máxima foi de $4,77 \times 10^6$, para o meio DMEM / IMDM com 5% SFB e $4,74 \times 10^6$ para o meio Hybridoma SFM. Valores da taxa de crescimento máxima foram de $0,0183 \text{ h}^{-1}$ para o meio com SFB e $0,0253 \text{ h}^{-1}$ para o meio sem SFB. Os valores obtidos estão de acordo com a literatura (ALTAMIRANO *et al.*, 2004), na qual consta que células de mamíferos têm taxas específicas de crescimento oscilando entre 0,02 e $0,04 \text{ h}^{-1}$. O tempo necessário para atingir a concentração máxima é de aproximadamente 5 dias, segundo a literatura; no presente trabalho obtivemos de $X_{\max}$ em tempo de 6 dias para meio com SFB e para o meio sem SFB. Nuñez e colaboradores (2014) chegaram à concentração máxima de $4 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ para células BHK-21C13, resultado similar ao alcançado nesse trabalho.

A queda da viabilidade normalmente se dá em razão da presença de metabólitos que inibem o crescimento celular, tais como lactato e amônio derivados do metabolismo da glicose e glutamina componentes do meio de cultura, que se acumula ao longo do processo comprometendo o crescimento celular. Uma alternativa para a solução deste problema, é o cultivo em modo contínuo, que caracteriza-se pela contínua adição do meio fresco e remoção do meio cultivado. Ambas as operações ocorrem à mesma vazão, de tal forma que se mantém constante o volume de trabalho no biorreator. No cultivo em perfusão, existe a retenção das células no interior da dorna, através de um dispositivo de retenção instalado. É o sistema que proporciona maior produtividade celular e, ao mesmo tempo, o mais complexo. O presente trabalho foi desenvolvido com o método de cultivo em batelada, onde não existe a renovação do meio de cultivo ao longo do

processo e as células crescem até o esgotamento de nutrientes e o acúmulo de metabólitos no meio ambiente (Figura 11).

Figura11- Células BHK21-C13 adaptadas para crescimento em suspensão, cultivo em biorreator de tanque agitado.

O controle eficiente do pH com adição de CO₂ ao longo do cultivo impede a acidificação intracelular, como consequência, a fisiologia celular normal é garantida. Assim os efeitos negativos da formação de lactato e amônio (a partir de glutamato) são reduzidos, devido à diminuição do efeito intrínseco da toxicidade e da osmolaridade.

Com base na relação direta entre a extremidade da fase exponencial e a depleção de glutamina, este não pode ser considerado o substrato limitante. O aumento da concentração de aminoácido em meio de cultura não é uma alternativa adequada para elevar a concentração máxima da célula, porque uma alta biossíntese de amônio pode ser induzida com a concentração de glutamina superior a 4mM (M BUTLER, 1989). Além disso, amônio é liberado por células também devido aos aminoácidos (formação de lactato também é possível a partir de glutamina) (SCHNEIDER *et al*, 1996).

A concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo em 50%, foi definida como adequada para esta linhagem celular proporcionando metabolismo mais eficiente, para ambos os meios de cultura para crescimento em biorreator,

considerando o desenho do equipamento e as condições de cultivo (NUÑEZ *et al.*, 2014). Em condições normais, células de mamíferos em biorreatores consomem grandes quantidades de glicose; cerca de 90% deste consumo é convertido em lactato (MULUKUTLA, CHANDRA, 2010). Assim, a utilização de glicose em condições ótimas foi semelhante aos outros valores reportados para a cultura BHK- 21 com altas concentrações de glicose (CRUZ *et al.*, 1999) e adequado para cultura de células de mamíferos (MULUKUTLA, CHANDRA, 2010) (figura 12).

Figura 12 - Concentração de substrato e metabólitos ao longo do cultivo em biorreator de tanque agitado (A) Glicose, (B) Glutamina, (C) L-Lactato e (D) Glutamato.

Os valores obtidos das análises das amostras em bioanalisador YSI2700 para substratos (glicose e glutamina) e para metabólitos (Lactato e glutamato), foram submetidos ao tratamento estatístico para comparação entre os cultivos em batelada com biorreator, utilizando os meios de cultivo DMEM/IMDM 5% SFB e Hybridoma SFM. Os resultados mostram que houve diferença significativa para o consumo de glicose entre os dois meios testados ($P = 0,02979$ $\alpha = 0,05$, *t de Student*). Da mesma forma não houve diferença significativa para o consumo de glutamina ($P = 0,0575$, $\alpha = 0,05$, *t de Student*). Para a produção de glutamato, não houve diferença

significativa ($P = 0,600$, $\alpha = 0,05$, *t de Student*) e para a produção de lactato houve diferença significativa ($P = 0,0396$, $\alpha = 0,05$, *t de Student*).

É possível observar que houve maior consumo de glicose e maior produção de lactato quando se utilizou o meio DMEM/IMDM suplementado com SFB. Células de mamíferos cultivadas *in vitro* estão altamente desreguladas e, na presença de concentrações de glicose não limitantes, ou seja, em concentração maior que a necessária para o crescimento, a consomem em velocidade muito maior (ALTAMIRANO, 2007).

Diferentes autores sugerem que a formação de lactato a partir do piruvato, via lactato desidrogenase (LDH), pode ser utilizada pela célula como uma forma de equilibrar seu potencial redox (MILLER, *et al.*, 1989). De fato, alta velocidade glicolítica gera NADH, que deveria ser reduzida a nicotina adenina dinucleotídeo (NAD) para manter a via glicolítica em funcionamento. Normalmente, a regeneração de NAD ocorre dentro da mitocôndria. No entanto, a membrana mitocondrial é impermeável a NADH, de forma que a célula necessita empregar um sistema transportador (*Shuttle systems*) para incorporar indiretamente equivalentes de NADH na mitocôndria e, posteriormente, oxidar esses compostos através da cadeia respiratória. O acúmulo de NADH no citosol pode saturar a cadeia respiratória inibindo o bom funcionamento da via glicolítica (ALTAMIRANO, 2007)

No presente trabalho é possível constatar que a velocidade de consumo de glicose foi maior com o meio suplementado com SFB, enquanto a produção de lactato foi antecipada provavelmente relacionada com a velocidade de consumo. Teoricamente a regeneração de NAD e NADH foi mais lenta, o meio sem SFB foi eficiente na conversão de NAD ou NADH, provavelmente por ter em sua composição, uma maior concentração de transferrina, para a via de transporte de ferro. Após 192h, a concentração de lactato é igual para ambos os meios (JENKINS, BUTLER, 1991).

A glutamina é o segundo componente principal dos meios de cultura empregados para o cultivo de células de mamíferos e, também, a principal fonte de geração de amônio. Na célula mediante diferentes condições normais de cultivo a 37°C, a glutamina sofre decomposição química parcial para ácido pirrolidina carboxílico e amônio. O restante da glutamina é incorporado na célula mediante

diferentes sistemas de transporte de aminoácidos, que não são específicos para glutamina, mas que participam da incorporação de uma série de aminoácidos relacionados. Além de importante papel da glutamina como fonte de energia para a célula, a glutamina também se apresenta como importante bloco estrutural para o metabolismo celular, sendo requerida como fonte de nitrogênio na síntese de pirimidinas e purinas, açúcares aminados, NAD, asparagina, bem como relação com a regulação de CO₂ durante o processo. O metabolismo da glutamina de forma análoga ao da glicólise, é denominado glutaminólise (FITZPATRICK, JENKINS, BUTLER, 1993).

Em consequência da desregulação metabólica das células de mamíferos cultivadas *in vitro*, ocorrem o rápido esgotamento da glicose e da glutamina e o acúmulo de lactato e amônio proveniente de glutamato no meio de cultivo. O crescimento e a viabilidade celular são afetados pelo esgotamento de nutrientes e pela concentração desses metabólitos inibitórios ou tóxicos para as células. O lactato altera a osmolaridade e acidifica o meio de cultivo e o amônio é formado a partir do glutamato. O glutamato é sintetizado por meio da ação da enzima glutaminase, e pode ser convertido em aminoácido γ -amino butirico (GABA), 2- oxaglutarato, glicose, ornitina e ureia ou participar da síntese de outros aminoácidos ou de glutatona. Quando associado à amônia (NH₃) e ao trifosfato de adenosina (ATP), sob a ação da enzima glutamina sintetase o glutamato converte-se novamente em glutamina (CHANDRA, 2016).

Os resultados obtidos para concentração de glutamina e glicose neste trabalho estão de acordo com os resultados publicados por Xiangming Sun et al. (2004), que analisaram a influência da glicose e da glutamina em células rCHO e as definiram como nutrientes obrigatórios não limitantes em altas concentrações, para esta linhagem celular, o que pode ser considerado uma característica para células de mamíferos. Cruz e colaboradores (1999), estudaram as mudanças no metabolismo de células BHK através da manipulação dos substratos glicose e glutamina em cultivos contínuos. Os autores observaram que, nos cultivos conduzidos com baixas concentrações de glutamina, a conversão de glutamina em células aumentou, levando a um metabolismo de glutamina mais eficiente.

Os fatores de conversão de substrato a células ou de substrato a produto são relevantes para a caracterização dos sistemas, bem como para o acompanhamento das mudanças metabólicas das células em cultivo. Os substratos são consumidos para formar células ou produtos e para gerar energia. Tais fatores de conversão podem ser obtidos para um intervalo de tempo Δt , através das equações de 4 a 7 (tabela 7).

Valores obtidos pelas equações de 4 a 7 em função do tempo de cultivo na fase de crescimento exponencial.

PARAMETROS	DMEM/IMDM SFB	HIBRIDOMA SFM	Unidade
<i>Y cel./glutamina</i>	4×10^3	3×10^5	Cel/ml/mg
<i>Y cel/glicose</i>	9×10^5	8×10^5	Cel/ml/g
<i>Y lactato/glicose</i>	0,806	0,576	g/g
Px	$0,032 \times 10^6$	$0,031 \times 10^6$	Cel/mL/h
IC	3,377	4,256	(%)

Tabela 7 – Fatores de conversão, comparativo para cultivo entre os meios DMEM/IMDM e HYBRIDOMA SFM. Y=fator de conversão, Px=Produtividade celular, IC=Índice de Crescimento.

A velocidade de consumo de glicose, para o meio DMEM/IMDM 5% SFB, e para o meio Hybridoma SFM, ficaram próximas, sendo $0,0566 \text{ g/L.h}^{-1}$, para o meio DMEM/IMDM 5% SFB e $0,0525 \text{ g/L.h}^{-1}$, para Hybridoma SFM. Os valores para consumo de glutamina foram de $0,0575 \text{ h}^{-1}$ para o meio DMEM/IMDM 5% SFB e $0,06466 \text{ h}^{-1}$ para Hybridoma SFM. O meio de cultura livre de soro, não requer suplementação com glicose ou glutamina. A velocidade de produção de L-Lactato para ambos os meios foi de $0,010 \text{ h}^{-1}$ para o meio DMEM/IMDM 5% SFB e $0,012 \text{ h}^{-1}$ para o meio Hybridoma SFM, enquanto os valores para velocidade de produção de glutamato foram $0,043 \text{ h}^{-1}$, para o meio DMEM/IMDM 5% SFB e $0,024 \text{ h}^{-1}$ para Hybridoma SFM. (figura 13).

Figura13 – Velocidade de consumo de nutrientes e formação de metabólitos na fase exponencial [A] consumo de glicose, [B] consumo de glutamina, [C] formação de L- lactato, [D] formação de glutamato.

A glicose e a glutamina, que municiam os precursores requeridos para vias biossintética e energética para as células, são intensamente consumidas. Em paralelo a isto, o lactato e o amônio são produzidos em grande quantidade. Tal comportamento se associa à incapacidade, por parte das células de mamíferos cultivadas *in vitro*, de regular o consumo de glicose e glutamina, o que se traduz no rápido esgotamento desses nutrientes no meio de cultivo e, concomitantemente, no acúmulo de subprodutos potencialmente tóxicos ou inibitórios.

Tais eventos contribuem para a limitação do crescimento celular. Geralmente se verifica que o início da fase estacionária e da morte celular coincide com o esgotamento da glicose. Esse padrão de comportamento é recorrente principalmente em batelada, sistema amplamente utilizado por sua simplicidade operacional, no qual as células são expostas a elevadas concentrações iniciais de glicose e glutamina; entretanto, isso também ocorre em sistema de batelada

alimentada, no qual após um determinado tempo de operação, ocorre o acúmulo de subprodutos potencialmente tóxicos ou inibitórios.

5.4 Custo de produção para células BHK21-C13

A produtividade celular (P_x) para as células BHK21-C13, ficou muito próxima em ambos os meios sendo $3,2 \times 10^5$ e $3,1 \times 10^5$ cel./mL.h⁻¹. A densidade celular máxima ($X_{máx}$) de $\sim 4,7 \times 10^6$ cel./mL foi alcançada em ambos os meios de cultivo no intervalo em torno de 145h de cultivo; a velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) foi de 0,01831h⁻¹ e 0,02533h⁻¹ e o tempo de duplicação (tD) 38,26 e 27,36hs.(figura 14).

Figura 14 – comparativo do desempenho das células BHK21-C13 entre os meios DMEM/IMDM 5% SFB e o meio HIBRIDOMA SFM.

No entanto é preciso considerar o custo financeiro de cada formulação, bem como a adequação do cultivo às exigências do mercado e a conformidade com as recomendações das agências reguladoras para biofármacos (tabela 8).

Tabela com os componentes, a concentração e o preço para cada formulação.

Componente	Concentração	Preço/litro (R\$)	Valor (R\$)
DMEM	50%	137,00	68,50
IMDM	50%	249,38	124,69
SFB	5%	920,00	46,00
Glutamina	4mM		0,41
Custo Total por Litro			239,60
Hybridoma SFM	100%	357,44	357,44
Custo Total por Litro			

Tabela 8 - Os preços acima definidos são para volume de 1L, sendo que, para volumes acima de 1.000, existe uma variação de 20 à 30% menor.

A formulação do meio DMEM/IMDM 5% SFB é uma composição entre os meios comerciais DMEM e IMDM suplementados com 5% SFB e 4mM de glutamina enquanto o meio Hybridoma SFM é um meio quimicamente definido livre de soro fetal bovino, sua formulação é mantida em sigilo.

O maior valor por litro do meio quimicamente definido Hybridoma SFM pode ser compensado, quando se leva em conta outros fatores impactantes no resultado final do processo. Um workshop para discutir as possibilidades de redução do uso de soro fetal bovino em cultura de células animais, foi organizado em 2003 (VAN DER VALK et al., 2004). O relatório dessa reunião fornece recomendações claras para por fim ao procedimento de extração do soro fetal bovino, considerando valores éticos de produção científica e também motivo de biosegurança em relação aos componentes de origem animal em métodos de cultura de células e tecidos. Outro fator que pode ser considerado é a variabilidade entre lotes e fornecedores o que dificulta a padronização do meio e a própria reprodutibilidade do cultivo (VAN DER VALK et al., 2004).

É recomendada pelas agências regulatórias a redução de componentes de origem animal na produção de biofármacos; por isso, a retirada do soro fetal bovino como suplemento no meio de cultivo, viabiliza a aprovação de um biofármaco de interesse. Considerando uma etapa importante no processo de produção, que normalmente tem impacto no custo final do produto, a etapa de purificação é bastante reduzida quando se elimina o soro fetal bovino na formulação, pois a quantidade de proteína e demais compostos presentes no SFB dificulta o processo para se obter um grau de pureza desejado.

6. CONCLUSÕES

- 1) No presente trabalho foi possível demonstrar que as células BHK21-C13 foram bem adaptadas para cultivo com meio Hybridoma SFM, considerando os valores cinéticos avaliados. Demonstrou que em tempo de cultivo similar é possível produzir uma concentração equivalente de células por mililitro.
- 2) Foi feita a caracterização cinética de crescimento e do metabolismo das células adaptadas e foi estabelecido um comparativo com as mesmas em cultivo suplementado com SFB. Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico para comparação entre as bateladas com e sem suplemento de SFB.
- 3) O comparativo entre os meios de cultura DMEM/IMDM e Hybridoma SFM, demonstrou que não houve diferença estatística entre os ensaios realizados, considerando os valores de X_{max} e μ_{max} , tempo de duplicação, viabilidade e a produtividade. Ao final do processo foi possível obter uma concentração celular próxima a $4,7 \times 10^6$ cel/mL, tanto para o cultivo com SFB quanto para o cultivo sem SFB.

Embora o custo por litro de meio utilizado no processo seja inferior para a condição com SFB, é preciso considerar que o produto final produzido sem SFB pode trazer um benefício, quando se consideram as exigências de mercado para a diminuição de proteína animal em biofármacos. O processo de purificação, etapa posterior ao cultivo, é favorecido quando se retira o SFB do meio de cultivo. A certificação do produto também é favorecida quando não se tem componentes derivados de proteínas de origem animal no produto final.

7. REFERÊNCIAS

- ALTAMIRANO C, C. PAREDES, J. CAIRÓ, F. G. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 69-75, 2000.
- ALTAMIRANO C., C. PAREDES, J. CAIRÓ, F. G. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 171-179, 2004.
- ALTAMIRANO C, J. CAIRÓ, F. G. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas in vitro. In: ROCCA (Ed.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. p. 105-119. 2007.
- AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: Castilho L.R. et al.; **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. 1. ed. London: Taylor & Francis Group, 2008. p. 75-110.
- BERG, MARK DE, ET AL. Computational geometry: algorithms and applications. **Published by springer-verlag**, n. 3, 2008.
- BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells. **Ind Microbiol Biotechnol**, v. 40, p. 257-274, 2013.
- BHANU CHANDRA MULUKUTLA, ANDREW YONGKY, TUNG LE, DOUGLAS G. MASHEK, W.-S. H. Regulation of Glucose Metabolism – A Perspective From Cell Bioprocessing. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 638-651, 2016.
- BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 425-432, 2007.
- BRUNNER, D. ET AL. Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive On Line Database. **ALTEX**, v. 25, p. 53-62, 2010.
- BUTLER, M. **Animal Cell Culture & Technology**. 2nd. ed. [s.l.] Scientific Publishers, 2005.
- CHANDRA, B. ET AL. Systems Analysis of CHO cell metabolism for enhanced fed-batch process performance: Identification of novel growth inhibitors and their control. ECI Digital Archives, Spring 5-11-2016.
- CHEN, Chun, HUONG Le, GOUDAR, Chetan T.; Integration of systems biology in cell line and process development for biopharmaceutical manufacturing, **Biochemical Engineering Journal**, v107, p. 11-17; 2016
- CLAUDIA KLOTH, GLENN MACLSAAC, HAILE GHEBREMARIAM, A. A. Inoculum Expansion Methods, Recombinant Mammalian Cell Lines. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**, 2010.

- CRUZ, H. J.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, n. 2, p. 104-113, 1999.
- DORAI, H. . ET AL. Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of chinese hamster ovary cells in culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 592-608, 2009.
- DOYLE, A. G. E. AL. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon- γ . **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 6, p. 1441-1445, 1994.
- EDWARDS, J. G. et al. Trypsinized bhk21 cells aggregate in the presence of metabolic inhibitors and in the absence of divalent cations. **J. Cell Sci**, v. 19, p. 653-667, 1975.
- EAGLE, Harry et al. The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. **Journal of Biological Chemistry**, v. 214, p. 839-852, 1955.
- EAGLE, Harry. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v. 130, n. 3373, p. 432-437, 1959.
- FERNANDEZ NUÑEZ, E. G. et al. Approach toward an efficient inoculum preparation stage for suspension BHK-21 cell culture. **Cytotechnology**, v. 68, n. 1, p. 95-104, 2016.
- FITZPATRICK.L; JENKINS.H.A.;BUTLER.M. Glucose and glutamine metabolism Of a B-lymphocyte hibridoma grown in batch culture. **BIOCHEM.BIOTECHNOL.**, v. 43, p. 93-116, 1993.
- FRANĚK, K;SRÁMKOVA, K. Cell suicide in starving hybridoma culture: survuval-signal effect of some aminio acids. **Cytotechnology**, v. 23, p. 231-239, 1997.
- FRESHNEY RI, **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**, 6th edition, John Willey an Sons, 2010.
- FRESHNEY RI. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, Alan R Liss Inc. New York, 2005.
- HAM, R.G.; MCKEEHAN, W.L. Media and growth requirements.In. **I.H. Methods in Enzymology**, v. 58, p. 44-93, 1979.
- HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. . The serial cultivation of human diploid cell strains.Experimental. **Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585-621, 1961.
- JENKINS.N.;BUTLER.M. **Mammalian cell biotechnology, a practical approach**,1991.
- KARP, Gerald; **Biologia Celular Molecular: Conceitos e Experimentos**; Manole, 2005.

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

KIM, J. Y.; KIM, Y.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 917-930, 2012.

KONAKOVSKY, VIKTOR, ET AL. Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness. **Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 5, 2016.

LINK, T. . ET AL. Bioprocess development for the production of a recombinant muc1 fusion protein expressed by cho-k1 cells in protein-free medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 51-62, 2004.

GUSKEY ,LOUIS E. AND JENKIN, HOWARD M., Adaptation ofBHK-21 Cells to Growth in Shaker Culture and Subsequent Challenge by Japanese Encephalitis Virus, **Applied microbiology**, Vol. 30, No. 3,p.433-438,1975.

MILLER, M. W.; WILKE.C.R.; BLANCH.H.W. The transient responses of hybridoma cell to nutrient additions in continuous culture; II. Glutamine pulse and step changes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 487-499, 1989.

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

MOLINARO E., CAPUTO L.F., A. M. . **Conceitos e Metodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2010.

MORAES,A.M; AUGUSTO, E.F.P; CASTILHO, R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1. ed. São Paulo, 2007.

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

MULUKUTLA, BHANU CHANDRA, ET AL. Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 476-484, 2010.

NUÑEZ, E. G. F. et al. Influence of aeration-homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism. **Cytotechnology**, v. 66, n. 4, p. 605-617, 2014.

PERRIN, P. et al. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. **Vaccine**, v. 13, n. 13, p. 1244-1250, 1995.

PULLA Reddy, B.Prsanna Reddy, D.Jayasimha Rayulu, Effects of fetal bovine serum concentration on the growth and survival of bhk 21 cell lines, **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v7, Issue 2, p122-127, 2016.

RAMIREZ, OCTAVIO T; Prefácio in:Tecnologia do cultivo de células animais de Biofármacos a Terapia Gênica; **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1. ed. São Paulo, 2007.

REBELLO, M. A. **Fundamentos da Cultura de Cultura de Tecido e das células Animais**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2014.

SALAZAR, ANDREW, KEUSGEN, MICHAEL, HAGEN, JÖRG VON; Amino acids in the cultivation of mammalian cells, **Amino Acids**, *Springer* V. 48:1161-1171, 2016.

SINACORE, MARTIN S. DENIS DRAPEAU S. R. ADAMSON. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. **Molecular Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 249-257, 2000.

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

SEN XU,HAO CHEN; High-density mammalian cell cultures in stirred-tank bioractor without external pH control, **Journal of biotechnology**,v231,p 149-159; 2016.

SILVA, A. C., DELGADO, I., SOUSA, M. F., CARRONDO, M. J., & ALVES, P. M. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petits ruminants vaccine. **Vaccine**, v. 26, n. 26, p. 3305-3311, 2008.

SPIER, R. . **Encyclopedia of Cell Technology**. [s.l.] Wiley-Interscience, 2000.

VAN DER VALK, J. et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2004.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 4, p. 1053-1063, 2010.

VISIONGAIN. **Biosimilars and Follow-On Biologics: Global Market Outlook 2010-2012**, 2012. Disponível em: <<https://www.visiongain.com/>>

WANG, C. S. Regioselective One-pot Protection of Carbohydrates. **nature**, v. 446, p. 896-899, 2007.

WITKOWSKI, J. A. Alexis carrel and the mysticism of tissue culture. **Medicine History**, v. 23, n. 3, p. 279-296, 1979.

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

XIANGMING SUN, Y. Z. Glutamine cannot support recombinant CHO cell growth and maintenance in the absence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 717-720, 2004.

Anexos