

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**Cultivo de Células de *Drosophila melanogaster*
em Diferentes Formulações de Meios de Cultura
Livres de Soro Visando a Produção da
Glicoproteína do Vírus da Raiva**

Adriana Lages Lima Galesi

Autora

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes

Orientadora

Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira

Co-orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas - SP
Julho de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

G132c Galesi, Adriana Lages Lima
Cultivo de células de *Drosophila melanogaster* em diferentes formulações de meios de cultura livres de soro visando a produção da glicoprotéina do vírus da raiva /Adriana Lages Lima Galesi.--Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Ângela Maria Moraes, Carlos Augusto Pereira

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. *Drosophila melanogaster*. 2. Meios de cultura (Biologia). 3. Hidrolisados de proteína I. Moraes, Ângela Maria Moraes. II. Pereira, Carlos Augusto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Culture of *Drosophila melanogaster* cells in different serum-free media formulations aiming rabies virus glycoprotein production

Palavras-chave em Inglês: *Drosophila melanogaster*, Culture media, Protein hydrolysates

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Márcia Regina da Silva Pedrini, Cláudio Alberto Torres Suazo, Elisabeth de Fátima Pires Augusto e Soraia Attie Calil Jorge

Data da defesa: 12/07/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Adriana Lages Lima Galesi e aprovada em 12 de julho de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



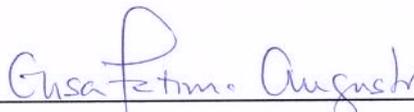
Prof^ª. Dr^ª. Ângela Maria Moraes

Orientadora – Faculdade de Engenharia Química /UNICAMP



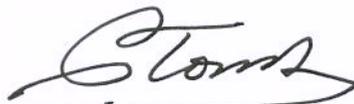
Prof^ª. Dr^ª. Soraia Attie Calil Jorge

Instituto Butantan



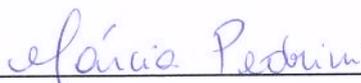
Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth de Fátima Pires Augusto

Instituto de Pesquisas Tecnológicas



Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo

Universidade Federal de São Carlos

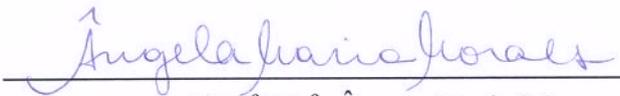


Prof^ª. Dr^ª. Márcia Regina da Silva Pedrini

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

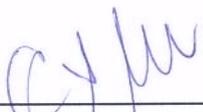
200754242

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Adriana Lages Lima Galesi e aprovada pela comissão julgadora em 12 de julho de 2007.



Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Moraes

Orientadora – Faculdade de Engenharia Química / UNICAMP



Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira

Co-Orientador / Instituto Butantan

*A minha princesinha Maria Clara,
razão da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e pela força no cumprimento de mais uma etapa.

Ao André, pelo amor, incentivo e dedicação em todos os momentos.

Aos meus pais Josemerce e Maria do Socorro, à minha irmã Carolina, à Tê e ao meu tio Mário, pelo amor e apoio incondicional.

A minha querida e admirável orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ângela Maria Moraes, por acreditar em meu potencial.

Ao meu co-orientador Dr. Carlos Augusto Pereira, pela grande contribuição no desenvolvimento deste trabalho e pela utilização das dependências do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan.

À querida amiga Fabiana Regina Xavier Batista, pelo estímulo constante e pelos momentos de descontração.

À Dr^ª. Elisabeth de Fátima Pires Augusto do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo pela grande contribuição em momentos fundamentais deste estudo e pela cessão de seu laboratório.

A todos os colegas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo, Patrícia, Rita, Fernanda, Vivien, Renato, Barral e Rosane, pela colaboração, e em especial ao Marcelo, pela realização do último ensaio.

Aos companheiros do Laboratório de Imunologia Viral, Adriana, Mateus, Lúcia, Renato, Mari, Soraia, Alexandra, Álvaro e Ronaldo, que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Sílvia Celina Alfieri e à Elizabeth Mieke Furusho Pral pela utilização do Laboratório de Biologia Celular e Bioquímica de Protozoários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela cessão do concentrado protéico de soro de leite.

À Capes e à Fapesp, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Células de inseto têm sido freqüentemente empregadas na obtenção de proteínas recombinantes devido a algumas vantagens em relação às células de mamíferos, e a linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2 é um dos sistemas de expressão utilizados para este propósito. Entretanto, a literatura é escassa em relação ao metabolismo e ao cultivo destas células, o que motivou o desenvolvimento deste trabalho.

O objetivo deste estudo foi determinar, através da técnica estatística de planejamento fatorial de experimentos, um meio de cultura adequado ao crescimento da linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2 transfectada para expressão da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) e avaliar seu comportamento nos diferentes meios formulados. Para tal, no meio basal TC100, foram estudados os efeitos dos suplementos glicose, glutamina, concentrado protéico de soro de leite, *yeastolate* (extrato de levedura), hidrolisado de soja, lactoalbumina hidrolisada, emulsão lipídica e Pluronic F68 sobre o crescimento e a viabilidade celular, na tentativa de reduzir o percentual de soro fetal bovino do meio de cultura. A combinação de diferentes suplementos permitiu que o soro fetal bovino fosse eliminado do meio de cultura, principalmente em decorrência da adição de *yeastolate*, e, em várias das formulações desenvolvidas, a densidade de células foi bastante superior àquela obtida empregando o meio basal TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino. O meio de cultura que resultou no melhor desempenho celular foi formulado com o meio TC100 suplementado com 10 g/L de glicose e 3,5 g/L de glutamina (concentrações finais), 3 g/L de *yeastolate*, 1% (v/v) de emulsão lipídica e 0,1 % (m/v) de Pluronic F68. Inicialmente, os ensaios realizados em biorreator não reproduziram o crescimento celular obtido em menor escala. Porém, com o aumento da concentração de Pluronic F68 para 0,6%, tal limitação foi contornada. Glicose não foi o substrato limitante nos meios formulados e lactato foi produzido em pequenas quantidades. Apesar de produzido em elevadas concentrações, o amônio não influenciou o crescimento celular. A dosagem da glicoproteína mostrou que as células não perderam sua capacidade de expressão após a adaptação em diferentes meios de cultura e que a produção de GPV no meio formulado é superior à verificada com os meios comerciais SF900 II e TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, meio de cultura livre de soro, *yeastolate*, hidrolisado de soja, emulsão lipídica.

ABSTRACT

Insect cells have been intensively employed to obtain recombinant proteins due to some advantages over mammalian cells, and the *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cell line is one of the expression systems used for this purpose. Nevertheless, literature is scarce with regard to metabolism and culture of these cells, what motivated the development of this work.

The aim of this study was to establish an adequate culture medium to cultivate *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells transfected for the expression of the rabies virus glycoprotein (GPV), and to evaluate their behaviour in different formulated media. For this, the factorial design strategy was employed. The effects of glucose, glutamine, whey protein concentrate, yeastolate, soy hydrolysate, lactalbumin hydrolysate, lipid emulsion and Pluronic F68 were studied over cell growth and viability, aiming to reduce the fetal bovine serum percentage from the culture medium. Adjusting the concentration of these distinct compounds, serum was eliminated, mainly due to the addition of yeastolate, and cell concentration was higher in several of the developed formulations than that achieved with basal TC100 medium supplemented with 10% of serum. The formulated medium which resulted in best cell performance was composed by TC100 containing 10 g/L of glucose, 3.5 g/L of glutamine, 3 g/L of yeastolate, 1% (v/v) of lipid emulsion and 0.1% (w/v) of Pluronic F68. When in bioreactor, initially the cells did not reproduce the growth behavior observed in smaller scale. However, increasing Pluronic F68 percentage to 0.6%, this limitation was circumvented. Glucose was not the limiting substrate in formulated culture media and lactate was produced in low quantities. Despite ammonium was produced in high concentrations, this compound did not influence cell growth. Glycoprotein quantification shows that cells did not lose their expression capacity after adaptation in the different media, and that glycoprotein production in the formulated medium was higher than that obtained in SF900 II medium and TC100 medium containing 10% of fetal bovine serum.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, serum-free culture medium, yeastolate, soy hydrolysate, lipid emulsion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1. Cultivo de Células Animais	7
3.2. Comparação entre o Cultivo de Células de Insetos e de Células de Mamíferos	8
3.3. Metabolismo de Células de Insetos	9
3.4. Cultivo de Células de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
3.5. Meios de Cultura Utilizados no Cultivo de Células de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
3.6. Alternativas ao Emprego do Soro Fetal Bovino	19
3.6.1. Extrato de Levedura e <i>Yeastolate</i>	20
3.6.2. Extratos de Leite	23
3.6.3. Lipídios	25
3.6.4. Hidrolisados de Plantas	25
3.7. Biorreatores para o Cultivo Celular	29
3.8. Cultivos da Linhagem <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2 em Biorreatores	32
3.9. Obtenção de Compostos Recombinantes através do Cultivo de Células de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
3.10. Planejamento Experimental e seu Papel na Otimização de Meios de Cultura	37
3.11. Relevância da Raiva como Problema Mundial de Saúde Pública	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Materiais	43
4.1.1. Linhagem Celular	43
4.1.2. Meios de Cultura e Nutrientes	43

4.2. Métodos	44
4.2.1. Manutenção e Propagação da Linhagem Celular	44
4.2.2. Preservação da Linhagem Celular	44
4.2.3. Adaptação das Linhagens S2 selvagem e S2AcGPV2 a Meios Basais e Cinéticas de Crescimento nos Meios SF900 II e TC100 (Ensaio AD-1, AD-2, AD-3, CIN-1 e CIN-2).....	44
4.2.4. Formulação de Diferentes Meios de Cultura.....	45
4.2.4.1. Avaliação da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, <i>Yeastolate</i> , Lactoalbumina Hidrolisada e Soro Fetal Bovino sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-1).....	46
4.2.4.2. Avaliação da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, Emulsão Lipídica e Soro Fetal Bovino sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-2).....	47
4.2.4.3. Avaliação da Adição de <i>Yeastolate</i> , Soro Fetal Bovino e Emulsão Lipídica sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-3).....	48
4.2.4.4 Avaliação da Adição de <i>Yeastolate</i> e Soro Fetal Bovino sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-4)	48
4.2.5. Adaptação, Crescimento Celular e Expressão do Produto em Meios Formulados Seleccionados (Ensaio CIN-3)	49
4.2.6. Remoção do Soro Fetal Bovino dos Meios de Cultura e Suplementação com Variadas Concentrações de <i>Yeastolate</i> (Ensaio CIN-4)	50
4.2.7. Efeito da Adição do Hidrolisado de Soja Hy Soy como Substituto do Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-5).....	50
4.2.8. Adaptação e Crescimento Celular na Formulação de Meio de Cultura Encontrada como a mais Adequada para o Crescimento das Células S2AcGPV2 (Ensaio CIN-6).....	50
4.2.9. Ensaio em Biorreator (Ensaio RE-1, RE-2 e RE-3)	51
4.2.10. Avaliação de Diferentes Concentrações de Pluronic F68 (Ensaio CIN-7).....	52

4.2.11. Ensaio em Biorreator com Aumento da Concentração de Pluronic F68 (Ensaio RE-4 e RE-5)	52
4.2.12. Sistemas de Cultivo	52
4.2.13. Métodos Analíticos.....	53
4.2.13.1. Monitoramento do Crescimento e Viabilidade Celular.....	53
4.2.13.2. Determinação das Concentrações de Glicose, Lactato e Glutamina no Meio de Cultura	53
4.2.13.3. Determinação da Concentração de Amônio	57
4.2.13.4. Determinação das Osmolalidades dos Meios de Cultura	58
4.2.13.5. Detecção da Glicoproteína do Vírus da Raiva.....	58
4.2.13.6. Imunofluorescência das Células S2AcGPV2	60
4.2.13.7. Determinação da Velocidade Específica Máxima de Crescimento.....	60
4.2.13.8. Determinação da Produtividade Celular Máxima	60
4.2.13.9. Determinação dos Consumos Específicos de Glicose e Glutamina	61
4.2.13.10. Determinação do Coeficiente de Rendimento de Células a partir de Glicose ($Y_{X/glc}$).....	61
4.2.13.11. Determinação do Coeficiente de Rendimento de Lactato a partir de Glicose ($Y_{lac/glc}$)	61
4.2.13.12. Cálculo do Teor de GPV	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. Cultivo das Linhagens S2 Selvagem e S2AcGPV2 em Meio SF900 II (Ensaio CIN-1)	63
5.2. Adaptação da Linhagem S2 Selvagem em Meio TNM-FH (Ensaio AD-1).....	69
5.3. Adaptação da Linhagem S2 Selvagem em Meio TC100 (Ensaio AD-2).....	72
5.4. Adaptação da Linhagem S2AcGPV2 em Meio TC100 (Ensaio AD-3).....	74
5.5. Cultivo das Linhagens S2 Selvagem e S2AcGPV2 em Meio TC100 Suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-2).....	76

5.6. Avaliação dos Efeitos da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, <i>Yeastolate</i> , Lactoalbumina Hidrolisada e Soro Fetal Bovino no Crescimento e na Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Fracionário 2 ⁴⁻¹ (Ensaio PF-1).....	81
5.7. Avaliação dos Efeitos da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, Soro Fetal Bovino e de uma Emulsão Lipídica no Crescimento e Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Completo 2 ³ (Ensaio PF-2)	85
5.8. Avaliação dos Efeitos da Adição de <i>Yeastolate</i> , Soro Fetal Bovino e de uma Emulsão Lipídica no Crescimento e Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Completo 2 ³ (Ensaio PF-3).....	87
5.9. Avaliação dos Efeitos da Adição de <i>Yeastolate</i> e Soro Fetal Bovino no Crescimento e Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Completo 2 ² (Ensaio PF-4).....	91
5.10. Adaptação e Crescimento Celular nos Meios Formulados com Baixo Conteúdo de Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-3)	95
5.11. Expressão da Glicoproteína do Vírus da Raiva pelas Células S2AcGPV2 Cultivadas nas Formulações 28 a 32 e nos Meios TC100 Suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e SF900 II	99
5.12. Remoção do Soro Fetal Bovino dos Meios de Cultura e Suplementação com Variadas Concentrações de <i>Yeastolate</i> (Ensaio CIN-4)	101
5.13. Efeito da Adição do Hidrolisado de Soja Hy Soy como Substituto do Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-5).....	105
5.14. Adaptação e Crescimento Celular na Formulação de Meio de Cultura Encontrada como a mais Adequada para o Crescimento das Células S2AcGPV2 (Ensaio CIN-6).....	109
5.15. Ensaios em Biorreator (Ensaios RE-1, RE-2 e RE-3)	113
5.16. Avaliação do Efeito de Diferentes Concentrações de Pluronic F68 (Ensaio CIN-7).....	120
5.17. Ensaios em Biorreator com Aumento da Concentração de Pluronic F68 (Ensaios RE-4 e RE-5)	121

5.18. Análise Preliminar da Viabilidade Econômica da Produção da Glicoproteína da Raiva pelas Células S2AcGPV2 em Meio TC100 Suplementado com <i>Yeastolate</i> , Emulsão Lipídica, Glicose, Glutamina e Pluronic F68	126
6. CONCLUSÕES	135
7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	137
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
APÊNDICE A	155
A-1: Formulações dos Meios de Cultura Desenvolvidos neste Trabalho	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Principais vias do metabolismo celular (Shuler e Kargi, 1992).....	11
Figura 3.2. Estrutura química do Pluronic F68.	31
Figura 3.3. Vírus rábico (adaptada de Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2007).....	40
Figura 4.1. Fluxograma de blocos indicativo dos ensaios realizados.....	54
Figura 5.1. Concentração de células viáveis (símbolos fechados) e viabilidade celular (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio SF900 II (ensaio CIN-1). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (♦) e 10×10^5 células viáveis/mL (●).....	64
Figura 5.2. Concentrações de glicose (símbolos fechados) e glutamina (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio SF900 II (ensaio CIN-1). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (♦) e 10×10^5 células viáveis/mL (●).....	65
Figura 5.3. Concentrações de lactato obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio SF900 II (ensaio CIN-1). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (♦) e 10×10^5 células viáveis/mL (●).	66
Figura 5.4. Viabilidade da linhagem S2 em cultivos em meio TNM-FH contendo 10% de SFB e diferentes percentuais de SF900 II (ensaio AD-1).	70
Figura 5.5. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em uma cultura com 50% de meio SF900 II e 50% de meio TNM-FH com 10% de soro fetal bovino (ensaio AD-1). As setas indicam os repiques realizados.....	71
Figura 5.6. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em um cultivo com redução do percentual de SF900 II no meio de cultura composto pelo meio TNM-FH com 10% de soro fetal bovino e meio SF900 II (ensaio AD-1). As setas indicam os repiques realizados.....	71
Figura 5.7. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em um cultivo com redução do percentual de SF900 II no meio de cultura composto por meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino e meio SF900 II (ensaio AD-2). As setas indicam os repiques realizados.....	73

Figura 5.8. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em um cultivo em meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino (ensaio AD-2). As setas indicam os repiques realizados.....	73
Figura 5.9. Viabilidade da linhagem S2AcGPV2 em um cultivo com redução do percentual de SF900 II no meio de cultura composto por meio TC100 com 10% de soro fetal bovino e meio SF900 II (ensaio AD-3). As setas indicam os repiques realizados.....	75
Figura 5.10. Viabilidade da linhagem S2AcGPV2 em um cultivo em meio TC100 com 10% de soro fetal bovino (ensaio AD-3). As setas indicam os repiques realizados.....	75
Figura 5.11. Concentração de células viáveis (símbolos fechados) e viabilidade celular (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio CIN-2). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (▲).	76
Figura 5.12. Concentrações de glicose (símbolos fechados) e glutamina (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio CIN-2). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (▲).	78
Figura 5.13. Concentrações de lactato obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio CIN-2). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (▲).	79
Figura 5.14. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com 4 replicatas no ponto central, nos quais foram avaliados os efeitos do concentrado protéico de soro de leite, do <i>yeastolate</i> , da lactoalbumina hidrolisada e do soro fetal bovino (ensaio PF-1). (■) Meio 1, (◇) meio 2, (△) meio 3, (×) meio 4, (▲) meio 5, (●) meio 6, (+) meio 7, (□) meio 8 e (○) meio 9.	82
Figura 5.15. Contrastes principais obtidos para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (concentrado protéico do soro de leite, <i>yeastolate</i> , lactoalbumina hidrolisada e soro fetal bovino) sobre a concentração de células viáveis (\square 10^4 células/mL) e a viabilidade celular (■ %) no sexto dia de cultivo (ensaio PF-1). * contrastes estatisticamente significativos a 90% de confiança.....	83

Figura 5.16. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, nos quais foram avaliados os efeitos do concentrado protéico de soro de leite, da emulsão lipídica e do soro fetal bovino (ensaio PF-2). (◆) Meio 10, (■) meio 11, (▲) meio 12, (×) meio 13, (△) meio 14, (●) meio 15, (○) meio 16, (◇) meio 17 e (+) meio 18.	86
Figura 5.17. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, nos quais foram avaliados os efeitos do <i>yeastolate</i> , da emulsão lipídica e do soro fetal bovino (ensaio PF-3). (◆) Meio 19, (■) meio 20, (▲) meio 21, (×) meio 22, (△) meio 23, (●) meio 24, (+) meio 25, (◇) meio 26 e (○) meio 27.	88
Figura 5.18. Efeitos obtidos para o planejamento fatorial completo 2^3 (<i>yeastolate</i> , emulsão lipídica e soro fetal bovino) sobre a concentração de células viáveis (□ 10^4 células/mL) e a viabilidade celular (■ %) no quinto dia de cultivo (ensaio PF-3). * efeitos estatisticamente significativos a 95% de confiança.	89
Figura 5.19. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais, nos quais foram avaliados os efeitos do <i>yeastolate</i> e do soro fetal bovino (ensaio PF-4). (●) Meio 28, (■) meio 29, (▲) meio 30, (◆) meio 31 e (◇) meio 32.....	92
Figura 5.20. Efeitos obtidos para o planejamento fatorial completo 2^2 (<i>yeastolate</i> e soro fetal bovino) sobre a concentração máxima de células viáveis (□ 10^5 células/mL) e a viabilidade celular (■ %) (ensaio PF-4). * contrastes estatisticamente significativos a 95% de confiança.....	93
Figura 5.21 Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), glutamina (D) e lactato (E) para as células S2AcGPV2 adaptadas aos meios 28 (◆), 29 (△), 30 (▲), 31(○), 32 (*), TC100 (◇) e SF900 II (■) (ensaio CIN-3).	96
Figura 5.22. Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), glutamina (D) e lactato (E) para as células S2AcGPV2 cultivadas em meios livres de soro com 1 g/L (◆), 2 g/L (△), 3 g/L (▲), 4 g/L (×), 5 g/L (○), 6 g/L (◇) e 7 g/L (□) de <i>yeastolate</i> (ensaio CIN-4).	102

Figura 5.23. Concentração máxima de células (◆), produtividade celular máxima (○), velocidade específica de crescimento (■) e osmolalidade (△) obtidas para diferentes concentrações de <i>yeastolate</i> no meio de cultura (ensaio CIN-4).....	103
Figura 5.24. Concentração de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), glutamina (D) e lactato (E) obtidas para as células S2AcGPV2 cultivadas em meios livres de soro com (◇) 1 g/L, (■) 2 g/L, (△) 3 g/L, (×) 4 g/L, (●) 5 g/L, (▲) 6 g/L e (+) 7 g/L de Hy Soy (ensaio CIN-5).	106
Figura 5.25. Concentração máxima de células (◆), produtividade celular máxima (○), velocidade específica de crescimento (■) e osmolalidade (△) obtidas para diferentes concentrações de Hy Soy no meio de cultura (ensaio CIN-5).....	107
Figura 5.26. (A) Concentração de células viáveis (■) e viabilidade celular (△). (B) Concentrações de glicose (●) e lactato (◇). Dados obtidos para as células S2AcGPV2 adaptadas ao meio livre de soro suplementado com 3 g/L de <i>yeastolate</i> (ensaio CIN-6).....	110
Figura 5.27. (A) Concentração de células viáveis (■) e viabilidade celular (△), concentração de GPV (□) e teor de GPV (■) obtidos no sobrenadante (A) e no lisado celular (B) para ensaio realizado em frascos <i>schott</i> , empregando-se meio livre de soro suplementado com 3 g/L de <i>yeastolate</i> (ensaio CIN-6).	111
Figura 5.28. Imunofluorescência das células S2AcGPV2 (A) e das células S2 selvagens (B) (ensaio CIN-6).....	113
Figura 5.29. Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), lactato (D) e amônio (E) obtidas para os ensaios RE-1 (●), RE-2 (■) e RE-3 (▲) em biorreator e para os ensaios em paralelo de acompanhamento em frascos <i>schott</i> SC-2 (□) e SC-3 (△).....	114
Figura 5.30. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-1.....	117
Figura 5.31. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-2.....	118

Figura 5.32. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-3.	118
Figura 5.33. Avaliação de diferentes concentrações de Pluronic F68 no crescimento das células S2AcGPV2 (ensaio CIN-7). (◆) 0,1%, (□)0,2%, (×)0,3%, (△)0,4%, (○)0,5% e (●)0,6%.	121
Figura 5.34. Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), lactato (D) e amônio (E) obtidas para os ensaios RE-4 (■) e RE-5 (▲) em biorreator e para os ensaios em paralelo de acompanhamento em frascos <i>schott</i> SC-4 (□) e SC-5 (△).....	123
Figura 5.35. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-4.....	124
Figura 5.36. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-5.....	125
Figura 5.37. Fluxograma simplificado da etapa de cultivo celular para a produção da glicoproteína do vírus da raiva pelas células S2AcGPV2.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Comparação entre o cultivo de células de insetos e células de mamíferos (Agathos, 1991; Wu e Goosen, 1993; Cha <i>et al.</i> , 2005).....	9
Tabela 3.2. Composição dos meios basais empregados no cultivo das células de <i>Drosophila melanogaster</i> e daqueles testados neste trabalho.	17
Tabela 3.3. Composição do concentrado protéico de soro de leite bovino (adaptada de Borges <i>et al.</i> , 2001).	24
Tabela 3.4. Trabalhos desenvolvidos enfocando o cultivo de células de <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2, visando a produção de proteínas recombinantes e partículas virais.	35
Tabela 4.1. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com quatro replicatas no ponto central (formulação 9) para avaliação dos efeitos da adição de CPSL, <i>yeastolate</i> , lactalbumina hidrolisada e SFB no meio base (ensaio PF-1).....	46
Tabela 4.2. Planejamento fatorial fracionário 2^3 com quatro replicatas no ponto central (formulação 18) para avaliação dos efeitos da adição de CPSL, SFB e de uma emulsão lipídica no meio base enriquecido com lactalbumina hidrolisada e <i>yeastolate</i> (ensaio PF-2).....	47
Tabela 4.3. Planejamento fatorial fracionário 2^3 com quatro replicatas no ponto central (formulação 27) para avaliação dos efeitos da adição de <i>yeastolate</i> , SFB e de uma emulsão lipídica no meio base enriquecido com lactalbumina hidrolisada (ensaio PF-3).	48
Tabela 4.4. Planejamento fatorial fracionário 2^2 com três replicatas no ponto central (formulação 32) para avaliação dos efeitos da adição de <i>yeastolate</i> e SFB no meio base enriquecido com emulsão lipídica (ensaio PF-4).	49
Tabela 4.5. Diferenças entre os ensaios realizados em biorreator.....	51
Tabela 4.6. Resumo das condições experimentais utilizadas nos ensaios realizados.....	55
Tabela 5.1. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} em que os efeitos da adição de concentrado	

protéico de soro de leite (CPSL), <i>yeastolate</i> , lactoalbumina hidrolisada e soro fetal bovino em meio TC100 foram estudados (ensaio PF-1).	83
Tabela 5.2. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo planejamento fatorial completo 2^3 em que os efeitos da adição de concentrado protéico de soro de leite (CPSL), soro fetal bovino e emulsão lipídica foram estudados (ensaio PF-2).	87
Tabela 5.3. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo planejamento fatorial completo 2^3 em que os efeitos da adição de <i>yeastolate</i> , soro fetal bovino e emulsão lipídica foram estudados (ensaio PF-3).	90
Tabela 5.4. Concentração celular máxima e viabilidade celular para os diferentes meios de cultura estudados através do planejamento fatorial completo 2^2 (<i>yeastolate</i> e soro fetal bovino) (ensaio PF-4).	92
Tabela 5.5: Análise de variância (ANOVA) para a concentração máxima de células para o planejamento fatorial completo 2^2 (<i>yeastolate</i> e soro fetal bovino) (ensaio PF-4).	94
Tabela 5.6. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo planejamento fatorial completo 2^2 em que os efeitos da adição de concentrado <i>yeastolate</i> e soro fetal bovino foram estudados (ensaio PF-4).	94
Tabela 5.7. Concentração máxima de células, velocidade específica máxima de crescimento, produtividade celular máxima e duração da fase lag obtidas para as células S2AcGPV2 adaptadas aos meios 28 a 32, TC100 suplementado com 10% de SFB e SF900 II (ensaio CIN-3).	97
Tabela 5.8. Produção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) pelas células adaptadas aos meios 28 a 32, TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino e SF900 II. Dosagens realizadas no lisado celular de amostras colhidas no 5 ^o dia de cultivo.	99
Tabela 5.9. Dados da literatura sobre a produção de proteínas recombinantes através do cultivo das células S2.	100
Tabela 5.10. Duração da fase lag e rendimento da produção de lactato em relação ao consumo de glicose obtidos para as células S2AcGPV2 cultivadas em meio livre de soro suplementado com 1 a 7 g/L de <i>yeastolate</i> (ensaio CIN-4).	103

Tabela 5.11. Duração da fase lag e rendimento da produção de lactato em relação ao consumo de glicose obtidos para as células S2AcGPV2 cultivadas em meio livre de soro suplementado com 1 a 7 g/L de Hy Soy (ensaio CIN-5).....	107
Tabela 5.12. Estimativa de custo dos equipamentos empregados na etapa de cultivo celular para a produção da glicoproteína do vírus da raiva.....	129
Tabela 5.13. Índices médios de composição do investimento total a partir do custo dos equipamentos (Petrides, 2000).	129
Tabela 5.14. Estimativa do custo de matéria-prima.	131
Tabela 5.15. Análise econômica global para a produção de GPV a partir das células S2AcGPV2.	132
Tabela A1. Composição de todas as formulações testadas.	155

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de células animais tem apresentado expressiva expansão nos últimos anos, sendo uma etapa fundamental de muitos bioprocessos. O desenvolvimento de métodos de caracterização, padronização e manutenção de linhagens celulares diversas, bem como de métodos de manipulação e cultivo celular possibilitou o desenvolvimento da tecnologia do cultivo destas células em laboratório e em escalas semi-industriais e industriais.

A síntese de proteínas recombinantes com atividades imunológicas e funcionais através do cultivo de células representa um dos principais avanços na biologia molecular e medicina preventiva. Dentre as células animais que têm sido usadas para este fim, destacam-se as células de mamíferos. Porém, apesar de terem capacidade de incorporar, manter, expressar e processar convenientemente genes heterólogos, estas células exigem condições de cultura delicadas e dispendiosas. Assim, devido à maior facilidade de cultivo e por serem capazes de realizar a maioria das modificações pós-tradução na complexidade requerida, as células de insetos têm gerado grande interesse nas áreas médica e farmacológica, possibilitando a obtenção de proteínas com potencial terapêutico, diagnóstico e profilático (como componentes de vacinas), e na agricultura, através dos bioinseticidas.

O cultivo de células de inseto emergiu nos últimos anos como uma alternativa atrativa para a expressão de proteínas recombinantes, tanto via vetor baculovírus, quanto através da transfecção de genes (Verma *et al.*, 1998). As células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 têm sido freqüentemente utilizadas para a obtenção de proteínas codificadas por genes heterólogos via baculovírus. Já a expressão genética estável é realizada normalmente em células de dípteros. Uma vez transfectadas, as células produzem constitutiva ou indutivamente a proteína heteróloga de interesse, que é coletada no sobrenadante ou no lisado celular. Apesar da utilização do baculovírus ser um sistema simples e bastante conveniente para a obtenção de quantidades consideráveis de proteína, ele apresenta algumas desvantagens como ser um sistema de expressão gênica transiente e o fato do pico de expressão ocorrer quando as células já entraram em estágio de morte ocasionada pela infecção viral.

Células embrionárias de dípteros como a linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) estão sendo utilizadas com sucesso na expressão de proteínas (Deml *et al.*, 1999a; Deml *et al.*, 1999b). Esta linhagem, em particular, tem sido utilizada para a expressão e o estudo de proteínas recombinantes como anticorpos (Kirkpatrick *et al.*, 1995), receptores (Millar *et al.*, 1995; Tota *et al.*, 1995; Vanden Broeck *et al.*, 1995; Torfs *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2003), enzimas (Gibson *et al.*, 1993; Banks *et al.*, 2003), inibidores tumorais (Valle *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2003), fatores de crescimento (Lee *et al.*, 2000) e antígenos virais (Deml *et al.*, 1999a; Deml *et al.*, 1999b; Bachmann *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de meios de cultura é uma etapa importante na obtenção de produtos recombinantes, e a suplementação de meios basais com nutrientes como glicose, aminoácidos, hidrolisados protéicos e lipídios tem sido bastante estudada na tentativa de reduzir ou eliminar o soro fetal bovino do cultivo de células. O soro é um composto altamente complexo e seu uso traz algumas desvantagens como o aumento do custo do meio de cultura, problemas de reprodutibilidade associados à variabilidade entre lotes, a possibilidade de introdução de contaminantes e dificuldades no processo de recuperação e purificação do bioproduto. Além disso, hoje em dia há uma forte recomendação por parte das agências controladoras da qualidade de bioprodutos para uso em humanos em não utilizar compostos de origem animal no cultivo de células, devido ao risco de contaminação. A formulação de meios de cultura livres de soro é particularmente importante no caso do cultivo de células de *Drosophila melanogaster*, pois os meios livres de soro disponíveis comercialmente para este fim não apresentam composição publicada em literatura, inviabilizando a obtenção de dados metabólicos, que já são bastante escassos na literatura.

Os hidrolisados protéicos têm sido uma alternativa promissora na tentativa de reduzir o percentual de soro no cultivo de células animais. Eles podem ser provenientes de tecidos animais, proteínas do leite, bactérias e leveduras e de proteínas vegetais e são uma fonte econômica de peptídeos pequenos e de aminoácidos livres e estáveis, lipídios, vitaminas e outros componentes de baixa massa molar. As emulsões lipídicas também são bastante importantes para o cultivo de células, já que contêm colesterol, ácidos graxos essenciais e α -tocoferol, componentes importantes para a formação da membrana celular e para a veiculação de compostos lipossolúveis.

Desta forma, o estudo de meios de cultura com formulações adequadas para a formação da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) foi o foco principal de estudo deste trabalho. Esta glicoproteína é uma proteína de membrana, que compõe o envelope viral, e induz proteção imunogênica contra o vírus da raiva. Contêm cerca de 500 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinalizador, dois sítios de glicosilação, dois sítios de acilação e uma cauda C-terminal hidrofílica (Da Poian *et al.*, 2005). No vírus da raiva, esta proteína apresenta uma conformação trimérica (3 x 65 KDa) e fica ancorada à membrana viral através de uma seqüência transmembrana localizada próxima à cauda C-terminal (Da Poian *et al.*, 2005). A vacina contra o vírus da raiva é um modelo particularmente interessante, pois é uma das únicas vacinas utilizadas tanto em humanos quanto em animais, e o emprego de um sistema de expressão baseado na transfecção permanente para a obtenção desta proteína levaria ao desenvolvimento de uma vacina mais efetiva e segura quando comparada às disponíveis atualmente, que são obtidas através da inativação de partículas virais obtidas pela infecção de células de mamíferos.

No presente estudo, foram avaliados os efeitos das concentrações de glicose e glutamina (fontes de carbono e nitrogênio), de Pluronic F68 (agente de estabilização das células ao cisalhamento), do percentual de soro fetal bovino sobre o crescimento celular e a formação de produto. Na tentativa de substituir parcial ou totalmente o soro fetal bovino do meio de cultura diferentes suplementos, como extrato de levedura, soro de leite bovino, lactoalbumina hidrolisada, hidrolisado de soja e uma emulsão lipídica, foram avaliados.

Destaca-se que este trabalho está inserido no projeto temático FAPESP intitulado “Expressão de genes heterólogos em células de dípteros: biologia molecular e engenharia de processos”, que tem como objetivo a clonagem dos genes da glicoproteína do vírus da raiva e do antígeno de superfície do vírus da hepatite B em vetores de expressão, para a construção de células de dípteros estavelmente transformadas para a expressão destes genes, além da otimização do bioprocessamento de produção destes antígenos em biorreatores e da avaliação de suas propriedades antigênicas e imunogênicas.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de um meio de cultura com percentual reduzido ou livre de soro fetal bovino que propiciasse condições adequadas para o desenvolvimento das células da linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2 transfectada para a produção da glicoproteína do vírus da raiva (células S2AcGPV2). Inseridos neste objetivo global estão os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliação do comportamento das células transfectadas quanto ao crescimento celular em meios basais suplementados com soro fetal bovino e meios comerciais livres de soro;
2. Estudo da influência da concentração de determinados componentes do meio, como a glicose, a glutamina e o soro fetal bovino, assim como de extrato de levedura, lactalbumina hidrolisada, soro de leite bovino, um hidrolisado de soja, uma emulsão lipídica e o agente estabilizante contra cisalhamento Pluronic F68, através da metodologia de planejamento fatorial, com o propósito de reduzir o percentual de soro fetal bovino no meio de cultura e maximizar o crescimento celular das células S2AcGPV2;
3. Verificação da expressão da glicoproteína do vírus da raiva pelas células S2AcGPV2 após sua adaptação a diversos meios de cultura;
4. Avaliação do comportamento celular em maior escala, empregando-se biorreatores e o meio de cultura que resultasse em melhor desempenho celular em pequena escala;
5. Análise preliminar da viabilidade técnico-econômica da produção da glicoproteína do vírus da raiva através do cultivo das células S2AcGPV2, empregando-se a formulação de meio de cultura desenvolvida neste trabalho.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Cultivo de Células Animais

O cultivo de tecidos animais teve início no princípio do século XX como forma de avaliar o comportamento celular na ausência de variações sistêmicas que ocorrem em um estudo *in vivo*. Até os anos 1950, apenas fragmentos de tecidos eram cultivados; a evolução da técnica de cultivo a partir de então, permitiu que células dispersas, obtidas através de desagregação química, mecânica e enzimática de seus tecidos originais, fossem cultivadas. Dentre os tipos de células propagadas *in vitro* estão células de insetos, de humanos, de camundongos, de ratos e de outros mamíferos.

Apesar das células animais apresentarem características diferentes das apresentadas pelos microrganismos, como crescimento mais lento, maior fragilidade mecânica e a necessidade de meios de cultura mais complexos e de suportes especiais para que o crescimento celular ocorra (Augusto e Oliveira, 2001), as técnicas de cultivo utilizadas para as células animais são similares às aquelas empregadas no cultivo de bactérias, fungos e leveduras.

Em comparação a estudos *in vivo*, o cultivo de células apresenta algumas vantagens, como a possibilidade da realização de um controle físico-químico mais adequado do ambiente e das condições fisiológicas, a melhor caracterização e homogeneidade da amostra e uma maior economia, já que os nutrientes podem apresentar concentrações definidas e mais baixas, pois o acesso às células é direto. Entretanto, existem também algumas limitações, como a necessidade de um ambiente complexo e de condições assépticas rigorosas e a obtenção de pequenas quantidades de produto (Freshney, 1994).

Desta forma, como estes sistemas apresentam alto grau de complexidade, com diversos fatores apresentando efeitos que podem, inclusive, ser sinérgicos ou antagônicos, é importante que os estudos para a obtenção de bioprodutos de interesse pelo cultivo de células animais sejam realizados de maneira criteriosa, visando elevadas produtividades, baixo custo e simplicidade operacional.

3.2. Comparação entre o Cultivo de Células de Insetos e de Células de Mamíferos

O cultivo de células de insetos teve início em 1915 e até a década de 1960 nenhuma linhagem capaz de se replicar indefinidamente tinha sido estabelecida. Somente em 1962, Grace demonstrou a habilidade das células de inseto *Antheraea eucalypti* se replicarem indefinidamente *in vitro* (Brooks e Kurti, 1971).

Uma comparação entre o cultivo de células de inseto e o de células de mamíferos, em termos das propriedades que afetam a tecnologia de propagação, revela várias similaridades e diferenças. Devido ao fato das linhagens de células de inseto se originarem tipicamente de tecidos de órgãos específicos ou embrionários não diferenciados, a mesma linhagem celular pode crescer tanto de maneira suspensa como aderida (em monocamadas). Esta versatilidade no modo de crescimento, que é contrastante com a maioria das linhagens de células de mamíferos, aumenta as escolhas do tipo de biorreator e da estratégia de cultivo para linhagens celulares industrialmente atrativas. A inibição por contato exibida por várias linhagens de células de mamíferos é consideravelmente amena ou ausente para células de inseto, que, em vez disso, têm a tendência de se agrupar, tanto em culturas suspensas como em aderidas.

O desprendimento de células de inseto aderidas de superfícies sólidas geralmente não requer tripsinização, ao contrário das células de mamíferos dependentes de suporte. Células de inseto, assim como as células de mamíferos, requerem assepsia rigorosa durante as transferências celulares, inoculação e propagação em biorreatores. Uma concentração de inóculo mínima é requerida para ambos os tipos de células. Tipicamente, culturas de células de inseto são iniciadas com inóculos de 1 a 2×10^5 células por mililitro de meio líquido (Agathos, 1991). A Tabela 3.1 sumariza as principais diferenças e semelhanças verificadas.

O cultivo de células de inseto tem sido bastante utilizado para a expressão de diversas proteínas recombinantes e diferentes linhagens celulares são utilizadas, como as linhagens *Spodoptera frugiperda* e High Five, de lepidópteros, e a linhagem *Drosophila melanogaster*, de dípteros.

Tabela 3.1. Comparação entre o cultivo de células de insetos e células de mamíferos (Agathos, 1991; Wu e Goosen, 1993; Cha *et al.*, 2005).

Características	Células de Inseto	Células de Mamíferos
Manutenção da linhagem celular	relativamente fácil	mais difícil
Versatilidade de suspensão e aderência	sim	não
Imortalidade	sim	apenas linhagens celulares transformadas
Inibição por contato	amena ou ausente	sim, exceto para algumas linhagens transformadas e linfóides
Destacamento da superfície do suporte	agitação delicada	tripsinização
Sensibilidade a mudanças no pH, oxigênio dissolvido, temperatura e osmolaridade	relativamente baixa	relativamente alta
Eficiência de plaqueamento	baixa	baixa
Adaptação a meios livres de soro	relativamente fácil	difícil
Sensibilidade ao cisalhamento	maior	menor
Produtividade	alta	baixa
Glicosilação simples	sim	sim
Glicosilação complexa	sim (com diferenças no padrão de glicosilação)	sim
Assepsia	requerida	requerida

3.3. Metabolismo de Células de Insetos

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre o metabolismo de células de inseto refere-se às linhagens de células de lepidópteros Sf9 e High Five. A glicose é o carboidrato mais importante para o cultivo destas linhagens, que também são capazes de consumir frutose e maltose. O metabolismo de carboidratos de células de insetos é bastante similar ao de células de mamíferos. A glicose é metabolizada principalmente pela glicólise, formando o piruvato, que pode ser convertido em lactato ou α -cetoacetato e entrar no ciclo do ácido cítrico, formando CO₂. Ao contrário das células de mamíferos, nas quais este carboidrato é geralmente metabolizado a uma taxa maior que a necessária, ocasionando um acúmulo de lactato no meio de cultura, células de inseto geralmente não acumulam grandes

quantidades deste metabólito, mesmo na presença de altas concentrações de glicose. Lactato pode ser também produzido em condições limitantes de oxigênio e consumido como fonte de carbono e energia.

Os aminoácidos podem ser utilizados por estas linhagens para biossíntese e como fonte de energia, suprimindo as necessidades de nitrogênio das células. Glutamina, glutamato, aspartato, serina, arginina, asparagina e metionina são utilizados como fonte de energia (Ikonomou *et al.*, 2003). Entretanto, o consumo de aminoácidos pode diferir para várias linhagens. As células High Five, por exemplo, consomem asparagina de maneira bastante rápida, sendo que sua escassez coincide com o início da fase estacionária, e requerem quantidades significativas de glutamina, cistina e tirosina. Já a suplementação dos meios de cultura com metionina e tirosina retardam a morte das células Sf9. Esta linhagem também é capaz de se desenvolver na ausência de glutamina, mas a velocidade de crescimento é reduzida, e pode sintetizá-la se íons amônio estiverem disponíveis (Ikonomou *et al.*, 2003).

Um outro metabólito importante no cultivo de células de inseto é o amônio. Células de inseto não são tão sensíveis a este metabólito quanto células de mamíferos, apresentando capacidade de dispor dele (e também de lactato) na forma de alanina. A alanina é um subproduto não tóxico do metabolismo da glicose e da glutamina. A Figura 3.1 mostra as principais vias do metabolismo celular.

3.4. Cultivo de Células de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster é um inseto pertencente à ordem *Diptera*, que contém cerca de 120.000 espécies. Devido à sua importância para o desenvolvimento da genética, por ser bastante utilizada como modelo em pesquisas, é a mais conhecida dentre todas as espécies do gênero *Drosophila*. De acordo com Echalier (1997), cerca de 100 linhagens de células de *Drosophila* já foram estabelecidas, porém apenas algumas delas são bastante utilizadas, como as linhagens Echalier e Ohanessian Kc e Kc0, Schneider S1, S2 e S3, Mosna e Dolfini GM1 e GM3 e Dübendorfer D1.

As linhagens de células de *Drosophila melanogaster* bem estabelecidas variam bastante em relação à aderência, o que pode ser modificado por uma seleção intencional ou não. De modo geral, a adesão celular é um pouco mais tênue que a da maioria das células de mamíferos e, em culturas bastante densas, as células geralmente se desprendem e ficam

dispersas no meio de cultura. Estas células raramente formam uma monocamada verdadeira, embora culturas de algumas linhagens bem adaptadas possam se tornar densas. Não há inibição por contato, e as células geralmente mostram uma tendência de se agregar e de se sobrepor, o que pode ser evitado por freqüentes subcultivos e pela redução do percentual de soro no meio de cultura (Echalier, 1997).

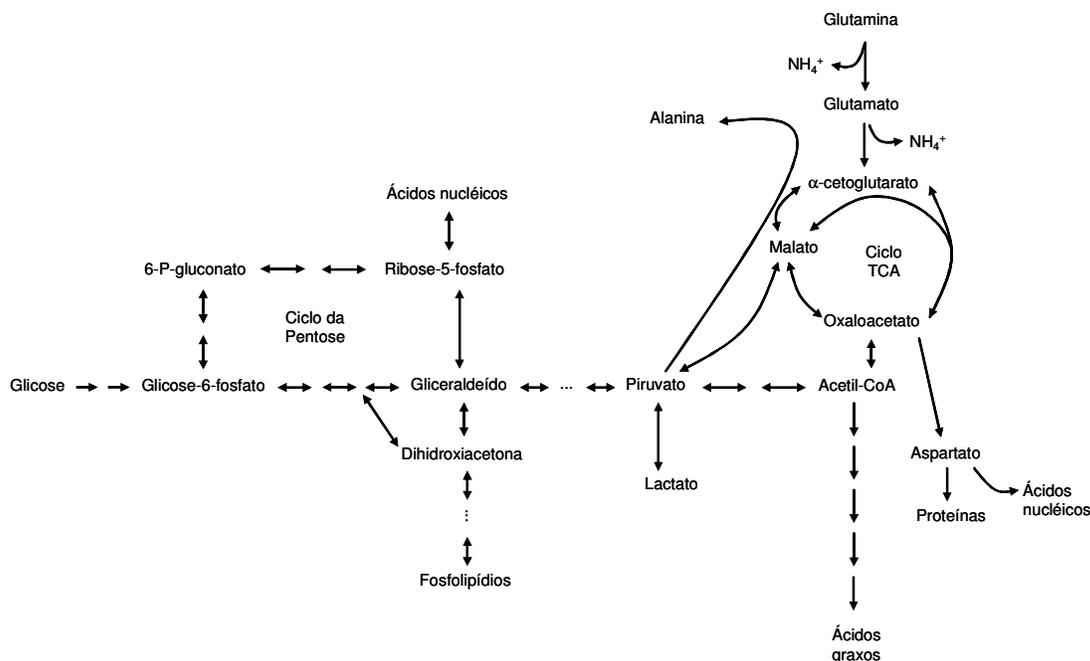


Figura 3.1. Principais vias do metabolismo celular (Shuler e Kargi, 1992)

A maioria dos meios de cultura utilizados atualmente para células de *Drosophila melanogaster* foram desenvolvidos quando os únicos dados analíticos disponíveis sobre fluidos extracelulares de *Drosophila melanogaster* eram sobre a hemolinfa da larva no terceiro estágio de desenvolvimento.

O pH da maioria dos meios de cultura desenvolvidos é ligeiramente ácido, e não há necessidade de utilizar o sistema de tamponamento CO_2 -bicarbonato, já que o controle da composição da fase gasosa não é realizado, como acontece para a maioria das culturas de células de mamíferos. O tamponamento é geralmente realizado pela grande quantidade de aminoácidos presentes nestes meios e, em alguns casos, um tampão como o fosfato é utilizado, embora a concentração deste composto necessária para uma efetiva estabilização

do pH pareça não ser bem tolerada pelas células. A temperatura para o crescimento destas linhagens está na faixa de 19 a 28°C.

Um dos principais desafios do cultivo de células animais, principalmente em maior escala, é o fornecimento adequado de oxigênio. O grau de agitação e, conseqüentemente, a taxa de transferência de oxigênio são limitados em cultivos em suspensão devido à sensibilidade das células ao cisalhamento. Por outro lado, cultivos em microcarregadores porosos, nos quais o estresse por cisalhamento é menor, resistências difusionais limitam a taxa de transferência de oxigênio, o que ocorre também com sistemas com alta densidade celular. Condições anaeróbias podem diminuir drasticamente o crescimento celular, enquanto que, em altas concentrações de oxigênio, danos oxidativos podem ser observados (Ozturk e Palsson, 1990). Não foram localizados dados na literatura sobre a concentração ótima de oxigênio dissolvido para o cultivo de células de *Drosophila melanogaster*. Sondergaard (1996) manteve o controle deste gás em 50% da saturação, enquanto, em Valle e colaboradores (2001), a concentração de O₂ foi mantida em 30%, sendo que ambos os cultivos foram realizados em biorreator.

Um parâmetro importante no desenvolvimento de meios de cultura é a osmolalidade, que representa uma medida do número de moles de espécies químicas em um quilograma de água. No caso de células de *Drosophila melanogaster*, a osmolalidade de meios como Schneider e D22 foi ajustada em cerca de 360 mOsm/Kg H₂O, com base no valor fisiológico. Entretanto, existem meios com valores de osmolalidade um pouco menores, como no caso do meio M3, em que a osmolalidade é de 330 mOsm/Kg H₂O, e meios com osmolalidade bastante alta, atingindo cerca de 440 mOsm/Kg H₂O, no caso do meio S-15. Wyss e Bachmann (1976) demonstraram que as linhagens de células de *Drosophila melanogaster* do tipo Kc e Ca foram capazes de proliferar em uma faixa de osmolalidade de 225 a 400 mOsm/Kg H₂O.

Os componentes do meio de cultura podem variar em tipo e quantidade de acordo com a linhagem celular. Dentre os componentes mais importantes destacam-se os citados por Mitsuhashi (1989), como sais inorgânicos, fontes de carbono e nitrogênio, aminoácidos, lipídios, ácidos orgânicos e vitaminas, discutidos a seguir.

Os sais inorgânicos são importantes na manutenção do balanço iônico e da pressão osmótica (Echalier, 1997). Dentre os meios de cultura utilizados no cultivo de células de

Drosophila melanogaster, há uma grande variação em relação a seus padrões iônicos, o que mostra que estas células podem suportar uma ampla faixa de concentração destes sais.

Os açúcares são importantes como fonte de energia, e a glicose é a principal fonte de energia e de material para a formação de esqueleto carbônico das células de inseto, sendo considerada como um nutriente limitante de crescimento para estas células (Bérdad *et al.*, 1993; Mendonça *et al.*, 1999). A sacarose está presente no meio TNM-FH e é empregada, na maioria das vezes, na manutenção da osmolalidade, não se tendo localizados relatos do consumo deste composto como fonte de energia. A trealose, açúcar mais abundante na hemolinfa da *Drosophila melanogaster*, encontra-se presente somente no meio Schneider, possivelmente porque este meio foi formulado originalmente baseado no fluido corpóreo deste inseto. Segundo Chen e colaboradores (2003), em condições de hipoxia, as células de *Drosophila melanogaster* sintetizam a trealose intracelularmente, com o intuito de aumentar a tolerância celular à falta de oxigênio. Ainda conforme Chen e colaboradores (2003), a trealose interage com as proteínas da membrana celular, modificando a permeabilidade e reduzindo gastos energéticos. Em adição, este carboidrato reduziria a concentração de ubiquitina, marcador para determinação de morte celular, evitando sua ocorrência precoce.

Além de necessários para a constituição de proteínas e o crescimento celular, os aminoácidos são importantes também para a manutenção da osmolalidade e, como já mencionado, do tamponamento. Alguns destes compostos podem ser sintetizados por certos tipos de células de inseto em determinadas condições. Os principais aminoácidos são alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina, e sua existência e quantidade variam com a linhagem celular. A glutamina é fonte essencial de nitrogênio para muitas espécies, podendo ser sintetizada por outras. Nos meios de cultura utilizados para células de *Drosophila melanogaster*, há uma grande quantidade de aminoácidos, devido à observação do alto conteúdo destes compostos presente no fluido corporal deste inseto. Os níveis de aminoácidos presentes em todos os meios para o cultivo de células de inseto são bem mais altos que os observados nos meios utilizados para o cultivo de células de vertebrados (Echalier, 1997). O fornecimento destes nutrientes é geralmente realizado através da adição de hidrolisados de proteínas nutricionalmente significativas ou com uma mistura definida de aminoácidos.

Os lipídios são considerados essenciais no crescimento celular, como constituintes de membranas, destacando-se o colesterol e os fosfolipídios, e podem ser empregados no transporte de compostos lipossolúveis, como vitaminas, para as células. Os ácidos orgânicos também são considerados importantes no crescimento celular.

As células de *Drosophila melanogaster* cultivadas *in vitro* necessitam principalmente das principais vitaminas do complexo B, como a maioria das células animais. Esta necessidade é geralmente suprida com a adição de uma quantidade significativa de extrato de levedura (cerca de 1 a 2 g/L). Na ausência deste composto, uma mistura suplementar de vitaminas é geralmente adicionada (Echalier, 1997). A vitamina E (α -tocoferol) é considerada um agente anti-oxidante, devendo ser adicionada aos meios de cultivo celulares (Maiorella *et al.*, 1988). O acetato de α -tocoferol (0,05% em volume) pode resultar na redução de 80% da apoptose ocasionada por exposição das células Sf9 a raios UV-B, como reportado por Mohan e colaboradores (2003).

Os meios de cultura empregados no cultivo de células são geralmente suplementados com soro sangüíneo, normalmente proveniente de bezerros e fetos bovinos. Este suplemento contém aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas, hormônios, lipídios e minerais. Geralmente, uma suplementação com soro fetal bovino em concentrações de 2 a 20% é requerida (Echalier, 1997). As principais funções do soro são estimular o crescimento e outras atividades celulares através de hormônios e fatores de crescimento, aumentar a adesão celular através de proteínas específicas e fornecer proteínas para o transporte de hormônios, minerais, lipídios (Freshney, 1994). Entretanto, o soro fetal bovino é um dos componentes de maior valor agregado no meio de cultivo, podendo também causar dificuldades no processo de recuperação e purificação de bioprodutos devido à presença de diversas proteínas, fatores de crescimento, entre outros componentes, alguns dos quais não definidos. Um forte limitante do uso do soro fetal bovino é a sua variabilidade com relação a diferentes lotes e fornecedores, o que dificulta a padronização do meio de cultivo e a própria reprodutibilidade do cultivo. Em adição, hoje em dia há uma forte recomendação por parte das agências controladoras da qualidade de bioprodutos para uso em humanos, como a *Food and Drug Administration (FDA)*, em não utilizar compostos de origem animal no cultivo de células, já que há o risco de carrear contaminantes de origem bovina, como o príon causador da encefalopatia espongiforme bovina (vulgarmente conhecida como doença da vaca louca). No entanto, células de insetos podem se

desenvolver em meios livres de soro (Mitsubishi, 1989), ou ainda, em meios pré-definidos suplementados com fatores encontrados no soro fetal bovino.

3.5. Meios de Cultura Utilizados no Cultivo de Células de *Drosophila melanogaster*

Dentre os meios de cultura basais desenvolvidos para o cultivo de linhagens de *Drosophila melanogaster*, destacam-se os meios D22, Schneider e M3. O meio D22 foi desenvolvido com base no fluido corpóreo da larva da *Drosophila melanogaster* e contém sais como cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, fosfato de sódio e cloreto de cálcio. Em adição, este meio também contém ácido málico, ácido succínico, acetato de sódio e ácido oxalacético dentre outros componentes como vitaminas, ácido glutâmico e glicina. Para o desenvolvimento adequado da cultura celular necessita-se da suplementação do meio de cultura com extrato de levedura (1 a 8 g/L), soro fetal de bovino (2 a 20%) e albumina hidrolisada (5 a 15 g/L), além de antibióticos (50 a 200 U/mL de penicilina e 50 a 100 µg/mL de streptomomicina) e antimicóticos (Wyss e Bachmann, 1976).

A principal diferença deste meio em comparação a outros meios utilizados para o cultivo de células de *Drosophila melanogaster*, com exceção do meio M3, é que a maioria dos sais à base de cloreto foram substituídos por glutamatos. O meio Schneider sofreu várias modificações desde sua formulação original, sendo que a principal foi a substituição da albumina hidrolisada por uma mistura definida de aminoácidos. Este meio também contém cerca de 2 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 2 g/L de extrato de levedura e é suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino. O meio M3 contém uma mistura definida de aminoácidos, 10 g/L de glicose, 1 g/L de extrato de levedura e é geralmente suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Embora os meios de cultura basais disponíveis sejam capazes de manter, com uma alta taxa de multiplicação, várias linhagens de células embrionárias de *Drosophila melanogaster*, nenhum deles pode ser considerado totalmente satisfatório. Isto é claramente demonstrado pela dificuldade de crescimento de células isoladas em vários deles, mesmo para linhagens celulares bem estabelecidas, e pelo crescimento variável de culturas primárias. Nenhum dos meios de cultura utilizados correntemente para o cultivo de células de *Drosophila melanogaster* se mostrou superior aos demais, pois todos eles suportam o

crescimento *in vitro* de várias linhagens celulares. A maior utilização do meio Schneider deve-se fundamentalmente ao seu maior tempo de comercialização (Echalier, 1997).

O envolvimento de empresas biotecnológicas no cultivo de células de inseto levou ao desenvolvimento de vários meios livres de soro (SF900 II, Drosophila-SFM, EX-Cell 420, Express Five SFM, Insect-XPRESS e HyQ SFX-Insect). Os meios livres de soro podem ser divididos em duas categorias, os meios quimicamente definidos e os meios semi-definidos, que contêm substâncias naturais complexas em substituição ao soro (Mitsuhashi, 1989). Os meios SF900 II e Insect-XPRESS são meios livres de proteínas desenvolvidos para o crescimento e manutenção de células de *Spodoptera frugiperda*, enquanto o meio Drosophila-SFM, também livre de proteínas, foi desenvolvido especialmente para a linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2. O meio EX-CELL 420 é um meio livre de soro que foi desenvolvido e otimizado para suportar o crescimento celular, a produção de baculovírus e a expressão de proteínas recombinantes em células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 e Sf21. Já o meio Express Five, também livre de proteínas, foi desenvolvido para células High Five. O meio HyQ SFX-Insect foi desenvolvido para suportar o crescimento de várias linhagens de inseto (Sf9, Sf21, High Five, S2) e para a produção de diversas proteínas recombinantes.

Neste trabalho, os meios basais TNM-FH e TC100, desenvolvidos originalmente para o cultivo de células de lepidópteros, foram testados para o cultivo da linhagem S2. O meio TNM-FH contém 3,33 g/L de lactoalbumina hidrolisada e 3,33 g/L de extrato de levedura e requer suplementação com 10% de soro fetal bovino. O meio TC100 contém 2 g/L de triptose e também requer suplementação com 10% de soro fetal. Ambos os meios são considerados semi-sintéticos, apresentando componentes de origem animal como a triptose, uma mistura de proteínas digeridas enzimaticamente, desenvolvida para substituir o extrato de carne comumente empregado em cultivos de microrganismos e células animais, e a lactoalbumina hidrolisada.

As formulações dos principais meios basais empregados para o cultivo de linhagens de *Drosophila melanogaster* e aqueles testados neste trabalho estão apresentadas na Tabela 3.2. Destaca-se que as formulações podem apresentar pequenas diferenças quando se comparam meios de cultura de marcas distintas.

Tabela 3.2. Composição dos meios basais empregados no cultivo das células de *Drosophila melanogaster* e daqueles testados neste trabalho.

Componentes	Concentração (mg/L)				
	D22	M3	Schneider	TC100	TNM-FH
<i>Sais inorgânicos</i>					
CaCl ₂	800	760,274	600	996,6	1000
KCl	-	-	1600	2870	2240
KH ₂ PO ₄	-	-	450	-	-
KHCO ₃	-	500	-	-	-
MgCl ₂	-	-	-	1070	1068,189
MgCl ₂ -6H ₂ O	900	-	-	-	-
MgSO ₄	-	2149,128	1807,221	1360	1357,856
MgSO ₄ -7H ₂ O	3360	-	-	-	-
NaCl	-	-	2100	500	-
NaHCO ₃	-	-	400	350	350
NaH ₂ PO ₄	-	880	700	-	876,923
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	-	-	-	1008,7	-
NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O	430	-	-	-	-
<i>Outros Componentes</i>					
Bis-Tris	-	1050	-	-	-
D-Glicose	1800	10000	2000	1100	700
D-Frutose	-	-	-	-	400
Ácido Acético	23	-	-	-	-
Ácido Fumárico	-	-	60	-	55
Ácido α-cetoglutarato	-	-	350	-	370
Lactoalbumina hidrolisada	13600	-	-	-	3333,3
Ácido Málico	600	-	600	-	670
Ácido Oxalacético	-	250	-	-	-
Ácido Succínico	55	-	60	-	60
Sacarose	-	-	-	-	26680
D-Trealose	-	-	2000	-	-
Triptose Broth	-	-	-	2000	-
Extrato de levedura	1360	1000	2000	-	3333,3
<i>Aminoácidos</i>					
Ácido Glutâmico	-	-	800	600	600
Ácido K-Glutâmico	5000	7880	-	-	-
Ácido Na-Glutâmico	8000	6530	-	-	-
Ácido Aspártico	-	300	400	350	350
L-Alanina	-	1500	-	225	225
β-Alanina	-	250	500	-	200
L-Arginina	-	500	600	-	-
L-Arginina-HCl	-	-	-	666	700
L-Asparagina	-	300	-	350	350
L-Cisteína	-	-	60	-	-
L-Cisteína-HCl	-	200	-	-	-
L-Cistina-2HCl	-	-	26,732	28,7	25
L-Fenilalanina	-	250	-	150	150
Glicina	5000	500	250	650	650

Tabela 3.2. Composição dos meios basais empregados no cultivo das células de *Drosophila melanogaster* e daqueles testados neste trabalho (cont.).

Componentes	Concentração (mg/L)				
	D22	M3	Schneider	TC100	TNM-FH
<i>Aminoácidos</i>					
L-Glutamina	-	600	1800	600	600
L-Histidina	-	550	400	3700	2500
L-Isoleucina	-	250	150	50	50
L-Leucina	-	400	150	75	75
L-Lisina	-	-	1650	-	-
L-Lisina-HCl	-	850	-	625	625
L-Metionina	-	250	150	50	50
L-Prolina	-	400	1700	350	350
L-Serina	-	350	250	550	-
DL-Serina	-	-	-	-	1100
L-Treonina	-	500	350	175	175
L-Triptofano	-	100	100	100	100
L-Tirosina-2Na	-	360,1	-	72,02	72,02
L-Tirosina-2Na, dihidratada	-	-	720,199	-	-
L-Valina	-	400	300	100	100
<i>Vitaminas</i>					
Biotina	0,01	-	-	0,01	0,01
D-Pantotenato de Cálcio	0,02	-	-	0,11	-
D-Pantotenato de Cálcio ½Ca	-	-	-	-	0,02
Cloreto de Colina	0,2	50	-	-	0,20
Ácido Fólico	0,02	-	-	0,02	0,02
i-Inositol	-	-	-	0,02	-
mio-Inositol	0,02	-	-	-	0,02
Ácido Nicotínico	-	-	-	0,02	-
Ácido p-Aminobenzóico	0,02	-	-	0,02	0,02
Niacina	0,02	-	-	-	0,02
Piridoxina HCl	0,02	-	-	0,02	0,02
Riboflavina	0,02	-	-	0,02	0,02
Tiamina	-	-	-	0,52	0,02
Tiamina HCl	0,02	-	-	-	-
Vitamina B ₁₂	-	-	-	0,01	-

*O meio TC100 e TNM-FH são meios formulados originalmente para lepidópteros. Fonte: meios M3, Schneider e TNM-FH obtidos do catálogo Sigma e meio TC100 obtido do catálogo Cultilab. Formulação do meio D22 obtida de Echalier (1997).

Em um estudo de formulação de meio de cultura, são necessárias a escolha e a adaptação das células a meios basais de formulação conhecida, para que seja possível avaliar diferentes componentes em diferentes concentrações. A otimização de meios de cultura requer testes interativos de cada um dos constituintes para determinar suas concentrações preferenciais. Isto deve, idealmente, ser feito com todos os componentes

simultaneamente porque, em tais sistemas multivariáveis, dois ou mais parâmetros podem estar relacionados. Um mesmo componente pode ser essencial em certas condições e não essencial em outras. É interessante confrontar, para cada parâmetro físico e para cada tipo de nutriente, os resultados obtidos com dados analíticos disponíveis sobre as linhagens celulares permanentes. Infelizmente, há poucos trabalhos disponíveis sobre o metabolismo e as necessidades específicas das células de *Drosophila melanogaster* em cultura, e as informações existentes referem-se às necessidades nutricionais deste inseto e de sua larva. Contudo, células diferenciadas cultivadas *in vitro* podem requerer nutrientes que não são requeridos pelo animal, porque, no organismo como um todo, eles devem ser fornecidos para atividades de outros tecidos (Echalier, 1997). Alguns trabalhos localizados na literatura relatam o cultivo das células S2 de maneira mais detalhada. Nestes, foram utilizados o meio Schneider suplementado com soro fetal bovino (Sondergaard, 1996) e os meios enriquecidos de formulação não divulgada HyQ SFX-Insect (Valle *et al.*, 2001) e SF900 II (Swiech, 2007).

3.6. Alternativas ao Emprego do Soro Fetal Bovino

A formulação de um meio de cultura é uma etapa importante para a produção de altas concentrações de proteínas recombinantes. As células de insetos são comumente cultivadas em meios basais, como os meios Grace, TNM-FH e TC100, suplementados com 5 a 10% de soro fetal bovino (Ikonomou *et al.*, 2003). Contudo, como já mencionado anteriormente, a presença deste suplemento no meio de cultura traz algumas desvantagens para o cultivo, como o aumento do custo do meio, problemas de controle de qualidade associados à variabilidade entre lotes e a possibilidade de introdução de contaminantes, como micoplasmas, príons e vírus, justificando as tentativas de cultivar células na ausência deste composto. Além disso, devido a seu conteúdo protéico, o soro fetal bovino interfere no processo de recuperação e purificação do bioproduto.

Desde 1980, tentativas têm sido feitas para eliminar o soro fetal bovino do cultivo de células de insetos (Hewlett, 1991; Ikonomou *et al.*, 2003). Embora a hemolinfa de insetos possa ser utilizada em substituição ao soro como fonte de fatores de crescimento, problemas como a inconsistência entre lotes e o fornecimento limitado, com a obtenção de

apenas cerca de 100 a 300 µL de hemolinfa por inseto, dificultam seu uso (Ikonomou *et al.*, 2003).

Uma alternativa bastante promissora para a tentativa de reduzir o percentual de soro no cultivo de células animais é o uso de hidrolisados protéicos, misturas complexas de oligopeptídeos, polipeptídeos e aminoácidos produzidas por digestão enzimática ou química de tecidos animais (triptose, peptona), proteínas do leite (caseína, lactoalbumina), bactérias e leveduras (*yeastolate*) e, mais recentemente proposto, de proteínas vegetais como as de soja, arroz, trigo, batata e ervilha (Deparis *et al.*, 2003).

Por muitos anos, os hidrolisados mais largamente empregados eram aqueles obtidos de tecidos animais, como a bactopectona, a proteose peptona e o Primatone RL (extrato de carne tripsinizado). Os hidrolisados podem ter um importante papel nutricional quando meios basais com nenhum ou com um baixo conteúdo de aminoácidos são utilizados, desempenhando com sucesso muitas funções do soro. A introdução de uma etapa de ultrafiltração na preparação de meios de cultura pode reduzir a variabilidade entre lotes de hidrolisados e assegurar uma boa reprodutibilidade no crescimento de linhagens de células de insetos (Ikonomou *et al.*, 2003).

3.6.1. Extrato de Levedura e *Yeastolate*

O extrato de levedura e o *yeastolate* têm sido utilizados principalmente como fontes de vitaminas (Mitsubishi, 1989), além de fornecer também carboidratos e aminoácidos (Ikonomou *et al.*, 2003). Ambos são obtidos por autólise em processos bastante similares, porém o *yeastolate* sofre ainda um processo de filtração para a remoção de proteínas com alta massa molar (Invitrogen, 2007). A forma de atuação destes compostos não é bem conhecida, entretanto, sua utilização é associada a resultados favoráveis do ponto de vista de crescimento celular. No estudo realizado por Drews e colaboradores (1995), observou-se um aumento no crescimento da linhagem Sf9 quando a concentração de extrato de levedura passou de 4 para 8 g/L, indicando que componentes presentes neste composto, como aminoácidos, peptídeos e ácidos nucleicos, promovem o crescimento celular. Entretanto, o aumento da concentração de extrato de levedura para 16 g/L ocasionou inibição do crescimento, que pode ter resultado da presença de componentes inibitórios no extrato de levedura ou do excessivo aumento da osmolalidade.

Wu e Lee (1998) estudaram o efeito da adição de diferentes suplementos em comparação ao *yeastolate*, para verificar se alguns deles apresentavam efeito equivalente ao verificado para este composto. Os suplementos testados foram a lactoalbumina hidrolisada, um concentrado lipídico, insulina, glicose, glutamina, o complexo de vitaminas B e várias purinas e pirimidinas. O estudo foi realizado com a linhagem celular Sf9. De todos os nutrientes adicionados nas culturas, o *yeastolate* foi o que apresentou o maior efeito promotor do crescimento sobre as células Sf9, seguido pela glutamina, que também mostrou um efeito significativo. O lipídio, a lactoalbumina hidrolisada e o complexo de bases nitrogenadas do tipo purínicas e pirimidínicas aumentaram discretamente o crescimento celular. Já a insulina e a vitamina B não mostraram efeitos positivos sobre o crescimento celular. Estes resultados mostraram que os componentes de ácidos nucleicos definidos e as vitaminas B, presentes em grandes quantidades no *yeastolate*, contribuem muito pouco para o efeito promotor do crescimento apresentado por este hidrolisado. A adição destes compostos ao meio de cultura não reproduziu o crescimento obtido com aquele suplemento, entretanto, o *yeastolate* contém peptídeos de baixa massa molar que podem desempenhar o papel de pequenos fatores de crescimento e hormônios, como aqueles existentes no soro.

Na produção de proteínas recombinantes através do processo em que baculovírus são empregados na infecção de células de insetos, a troca de meio de cultura antes da infecção viral é muitas vezes recomendável para a obtenção de altos rendimentos de proteínas recombinantes. Wu e colaboradores (1998) verificaram a possibilidade de reaproveitar este meio descartado e, com a adição de nutrientes, verificar se este poderia suportar o crescimento de células em uma nova batelada. Os experimentos foram realizados com as linhagens Sf9 e High Five em frascos agitados, empregando-se o meio IPL-41 suplementado com 10% de soro fetal bovino. O meio condicionado foi coletado quando a cultura estava no final da fase exponencial. Cinco diferentes suplementos, glicose, glutamina, *yeastolate*, concentrado lipídico e um complexo de aminoácidos com exceção da glutamina e diferentes percentuais de meio fresco foram testados, empregando-se a linhagem High Five. Verificou-se que, no meio condicionado sem a suplementação com meio fresco, a adição de glicose, glutamina, emulsão lipídica e do complexo de aminoácidos de maneira isolada causou um pequeno aumento na concentração celular em comparação com o cultivo realizado apenas no meio condicionado sem a adição de

qualquer nutriente. A adição de *yeastolate*, por sua vez, apresentou uma grande influência no crescimento celular. No meio contendo glicose, glutamina e *yeastolate*, a concentração celular máxima atingida foi um pouco maior que a obtida com a adição de *yeastolate* apenas. Com 10% de meio fresco e a adição de *yeastolate*, glicose e glutamina, a concentração celular obtida foi cerca de 80% daquela obtida com o meio totalmente fresco, e, com 15 a 20% de meio fresco, as concentrações celulares máximas foram bastante similares. A adição da emulsão lipídica e do complexo de aminoácidos em suplementação aos outros três componentes acarretou uma diminuição da concentração celular nos meios suplementados com 0, 10 e 20% de meio fresco. Este experimento mostrou que o meio condicionado pode ser utilizado pelo menos uma vez para o cultivo celular sem nenhum efeito inibitório e que o *yeastolate* teve um papel essencial na fortificação deste meio, que apresentou a seguinte formulação final: 8 g/L de *yeastolate*, 2 g/L de glicose, 8 mM/L de glutamina e de 15 a 20% de meio fresco. A utilização desta formulação com as células Sf9 também se mostrou bastante efetiva. Em relação à produção de proteína recombinante, verificou-se que, para os dois tipos de células, os rendimentos obtidos com a utilização do meio condicionado foram bastante próximos dos obtidos com o cultivo das células em meio fresco.

Nishikawa e colaboradores (2003) avaliaram a produção de β -galactosidase por células Sf9 infectadas pelo baculovírus *Autographa californica* nucleopoliedrovírus (AcNPV) em meios basais sem a suplementação com soro fetal bovino. Os meios de cultura utilizados foram os meios Grace e TNM-FH (meio Grace suplementado com extrato de levedura e lactoalbumina hidrolisada). Em uma primeira etapa, apenas o crescimento celular das células foi avaliado nos meios suplementados e não suplementados com soro fetal bovino. Meios sem soro suplementados com uma mistura lipídica ou com ácido fosfatídico também foram avaliados. Observou-se que as maiores densidades celulares ocorreram nos meios suplementados com 10% de soro fetal bovino. Já o meio Grace sem soro fetal bovino não suportou o crescimento celular. No caso do meio TNM-FH na ausência de soro, as células cresceram a uma menor velocidade e atingiram cerca de 22% da concentração máxima atingida pela cultura em que havia a suplementação com soro. A adição de lipídios e de ácido fosfatídico aos meios sem soro não estimulou o crescimento na cultura com meio Grace, mas foi efetiva nas culturas em meio TNM-FH.

Quanto à produção de proteína recombinante, os níveis atingidos com os meios suplementados com soro fetal bovino foram bem maiores que aqueles obtidos nos meios sem soro, e, em ambos os casos, a produção de β -galactosidase foi maior com o meio TNM-FH, indicando que a lactoalbumina hidrolisada e/ou o extrato de levedura são importantes na produção desta proteína. Para verificar qual destes dois compostos seria mais efetivo na estimulação da produção de β -galactosidase, seus efeitos foram estudados através da adição isolada destes compostos no meio Grace. Verificou-se que ambos apresentaram um efeito promotor sobre a produção da proteína, sendo que o efeito apresentado pelo extrato de levedura foi maior, e que, quando adicionados em conjunto (meio TNM-FH), a produção de proteína era maior. Um outro estudo também mostrou que estes compostos são essenciais até um dia pós-infecção, não sendo mais necessários a partir de então. O ácido fosfatídico também se mostrou essencial para a produção de β -galactosidase, o que não ocorreu com a mistura lipídica.

3.6.2. Extratos de Leite

Apesar do leite também ser de origem animal, a diversidade de compostos presentes neste suplemento é significativamente menor que a do soro fetal bovino, e a suplementação de meios de cultura com leite, colostro e extratos de soro tem sido realizada por alguns grupos de pesquisa para o cultivo de células animais (Ramírez *et al.*, 1990; Amiot *et al.*, 2004). A atividade do leite em promover o crescimento celular está relacionada a muitos de seus constituintes, incluindo nutrientes como minerais, vitaminas, carboidratos, aminoácidos como a glutamina, hormônios e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento do leite têm massa molecular na faixa de 3 a 20 KDa e produzem sinais intracelulares modificando o consumo de nutrientes, a síntese de DNA e a divisão celular (Amiot *et al.*, 2004). Outras proteínas constituintes do leite, como as caseínas e a lactoalbumina, contêm seqüências de aminoácidos com diversificadas atividades biológicas, e, com a hidrólise destas proteínas, estes peptídeos também podem ser utilizados para o cultivo de células (Drews *et al.*, 1995; Wu e Lee, 1998).

No leite de algumas espécies, especialmente a bovina, 80% das proteínas são caseínas e os 20% restantes são representados pelas proteínas do soro. As caseínas podem ser obtidas a partir do leite desnatado por dois processos principais, a precipitação ácida no

pH isoelétrico (pH 4,6 a 20°C), e a coagulação enzimática (a 34°C, por 40 a 60 minutos) pela ação da enzima quimosina. O soro obtido pela precipitação ácida das caseínas denomina-se soro ácido, enquanto que o obtido pela coagulação enzimática das caseínas é tradicionalmente conhecido como soro doce (Borges *et al.*, 2001) e foi utilizado para a obtenção do concentrado protéico utilizado neste trabalho. A composição média do concentrado protéico de soro de leite é apresentada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Composição do concentrado protéico de soro de leite bovino (adaptada de Borges *et al.*, 2001).

Componentes	Porcentagem em massa
proteínas	83,84
cinzas	2,77
lactose	8,87
lipídios	4,48

Ramírez e colaboradores (1990) utilizaram leite e colostro com o objetivo de reduzir o percentual de soro fetal bovino no cultivo de um hibridoma murino. Eles observaram que o colostro pode promover o crescimento celular e a produção de anticorpos monoclonais na ausência de soro fetal bovino. Os mesmos resultados não foram obtidos com a adição de leite, mas sua combinação com um pequeno percentual de soro aumentou as propriedades promotoras do crescimento do soro, o mesmo acontecendo com a combinação colostro e soro. O emprego destes suplementos não modificou a taxa de produção de anticorpos. O efeito sinérgico destes suplementos com o soro não apenas diminuiu o custo do meio de cultura, mas também aumentou a economia global do processo de produção dos anticorpos monoclonais.

Resultados do cultivo de células de inseto *Spodoptera frugiperda* Sf9 mostram que o soro fetal bovino, normalmente empregado para suplementar o meio de cultura Grace, pode ser eficientemente substituído pelos suplementos extrato de levedura e soro de leite liofilizado (Batista *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 2005). Os resultados indicam aumentos de cerca de 5 vezes na produtividade celular e de cerca de 3 vezes na produção de baculovírus, com relação ao meio Grace suplementado com soro fetal bovino, o que aponta para uma

redução substancial no custo com o meio de cultura. O alvo, nestes estudos em particular, foi otimizar a composição do meio de forma a obter um bom desempenho celular, empregando um meio de composição mais definida.

3.6.3. Lipídios

Outro suplemento de meio de cultura bastante importante para o crescimento celular na ausência de soro fetal bovino são os lipídios, constituintes importantes das células. São os principais componentes das membranas e promovem barreiras de permeabilidade que são fundamentais para a função e a sobrevivência celular. A maioria dos meios livres de soro inclui ácidos graxos essenciais em sua formulação para substituir as propriedades promotoras do crescimento dos componentes lipídicos do soro. Um concentrado lipídico utilizado para o cultivo de células animais geralmente é composto por Pluronic F68, Tween 80, ácidos graxos, tocoferol e colesterol. A concentração de lipídios na maioria dos meios livres de soro para o cultivo de células de mamíferos está geralmente na faixa de 10 a 100 µg/L. A concentração de lipídios nos meios livres de soro para o cultivo de células de inseto é, contudo, muito maior, na faixa de 1000 µg/L (Shen *et al.*, 2004). A suplementação de lipídios em meios livres de soro é essencial para estimular o crescimento celular e para aumentar a robustez das células em culturas agitadas. Donaldson e Shuler (1998) observaram o aumento da viabilidade das células Tn5B1-4 com a adição de uma mistura lipídica. A adição de 1% da mistura lipídica ocasionou um aumento da viabilidade de 80% para cerca de 95% e, com a adição de 1,5%, a viabilidade celular subiu para 98 a 99%. Já a concentração celular máxima obtida com 2,5% de emulsão lipídica foi cerca de 15% maior que a obtida com a cultura que continha 1,5%.

3.6.4. Hidrolisados de Plantas

Ultimamente, a utilização de hidrolisados de plantas tem sido intensificada devido aos problemas oriundos da suplementação com compostos de origem animal, com a publicação de vários artigos e patentes (Ikonomou *et al.*, 2003). Donaldson e Shuler (1998) desenvolveram um meio de cultura para as células Tn5B1-4, avaliando o efeito do hidrolisado de soja Hy Soy, do Primatone RL, do *yeastolate* e de uma emulsão lipídica

contendo Pluronic F68. No desenvolvimento do meio de cultura, no qual o meio IPL-41 foi utilizado como meio basal, verificou-se que o *yeastolate* foi o principal nutriente para um adequado crescimento celular. Uma concentração de 4 g/L deste suplemento foi suficiente para um bom desempenho celular, mas escolheu-se a concentração de 6 g/L para ser adicionada ao meio, já que o desempenho apresentado pelas células foi o mesmo e a disponibilidade de nutrientes para a expressão de proteínas a altas densidades celulares era maior. A adição de 1% da mistura lipídica elevou a viabilidade celular de 80 para cerca de 95%, e, com uma suplementação maior (1,5% de lipídios), a viabilidade subiu para 98-99%. A presença de 2,5% da mistura lipídio-Pluronic causou um aumento no crescimento celular. Já em relação ao hidrolisado de soja, os resultados mostraram que este suplemento foi adequado quando combinado com soro fetal ou com *yeastolate*, mas a adição apenas deste composto ao meio de cultura não promoveu o crescimento. O Primatone RL também não foi benéfico ao crescimento celular. O meio de cultura desenvolvido, meio IPL-41 suplementado com 7,5 g/L de glicose, 4 g/L de Hy Soy, 6 g/L de *yeastolate*, 2,5 % da mistura lipídio-Pluronic F68 e 0,1 g/L de sulfato de dextrana, resultou em crescimento celular e produção de proteína similares aos observados para o meio Ex-Cell 405.

Heidemann e colaboradores (2000) também avaliaram a utilização de extratos de planta no cultivo de células. Hidrolisados de soja (NZ-Soy Peptone, NZ-Soy BL-4 e Hy Soy), de trigo (Hy Pep 4601) e de arroz (Hy Pep 5603) foram testados no crescimento das células de mamíferos BHK-21 produzindo uma proteína terapêutica. Os resultados mostraram que a qualidade do produto e os padrões de glicosilação não foram afetados pela presença destes hidrolisados no meio de cultura, e a produtividade específica aumentou cerca de 20 a 30%, apesar dos hidrolisados não apresentarem efeito de proteção contra a degradação proteolítica. Os melhores resultados foram obtidos com os hidrolisados de soja (NZ-Soy Peptone e NZ-Soy BL-4) em comparação com o de trigo e o de arroz.

Ikonomou e colaboradores (2001) utilizaram a estratégia de planejamento fatorial para a seleção e subsequente otimização da concentração de hidrolisados protéicos em um meio livre de soro capaz de suportar o crescimento das linhagens Sf9 e High Five. O meio selecionado como meio basal foi o IPL-41, devido à sua formulação relativamente simples e sua facilidade de filtração. A glicose também foi escolhida como a principal fonte de carbono, já que é o carboidrato mais importante no cultivo de células de inseto, sendo o meio suplementado a uma concentração final de 10 g/L deste composto. Sete hidrolisados

foram testados através de um planejamento fatorial fracionário 2^{7-4} , sendo eles *yeastolate*, lactoalbumina hidrolisada, triptose fosfato, Primatone RL (hidrolisado de tecido animal), hidrolisado de soja, hidrolisado de arroz e um hidrolisado de trigo. Nos ensaios também foram adicionados uma mistura lipídica e Pluronic F68. A linhagem High Five foi a escolhida para a realização deste planejamento, pois, devido à sua alta sensibilidade em relação à qualidade dos hidrolisados, efeitos tóxicos destes compostos poderiam ser mais facilmente identificados. Com este experimento observou-se que as culturas que continham *yeastolate* atingiram as maiores densidades celulares. A análise dos efeitos mostrou que o *yeastolate* apresentou a maior influência sobre a concentração celular final, e este suplemento foi escolhido para estudos posteriores. A escolha do segundo hidrolisado foi feita com base nos perfis de crescimento e nos dados metabólicos. A cultura que continha *yeastolate*, lactoalbumina hidrolisada e Primatone RL apresentou um crescimento muito similar ao encontrado para a cultura controle realizada no meio rico e livre de soro Insect-XPRESS. O Primatone RL foi escolhido então porque, além de ser uma fonte rica em di e tripeptídeos, mostrou ter propriedades anti-apoptóticas em culturas de células de mamíferos (Schlaeger, 1996).

As concentrações destes dois hidrolisados foram então otimizadas através de um experimento do tipo planejamento fatorial completo 2^2 . A análise dos efeitos mostrou que o *yeastolate* teve o efeito mais importante no crescimento celular. A presença de ambos os hidrolisados em seus maiores níveis resultou em maior crescimento celular e em maior concentração final de células. A formulação final do meio de cultura proposto por este grupo de pesquisa, denominado meio YPR, foi de 10 g/L de glicose, 15 a 17mM de glutamina, 0,6% *yeastolate*, 0,5% Primatone RL e 0,1% da mistura lipídio-Pluronic F68, sendo IPL-41 o meio basal.

O crescimento celular no meio YPR foi comparado então ao de crescimento em outros meios livres de soro, como HyQ SFX-Insect e EX-Cell 405, para as células High Five, e nos meios HyQ SFX-Insect, Insect-XPRESS e SF900 II para as células Sf9. O cultivo foi realizado em frascos agitados. Para as células High Five, a maior concentração celular foi obtida no meio YPR, seguida pelos meios EX-Cell 405 e HyQ SFX-Insect. As velocidades máximas de crescimento específico foram muito próximas entre os meio YPR e HyQ SFX-Insect, que foram maiores que a observada para o meio EX-Cell 405. No caso das células Sf9, a maior concentração celular também foi atingida pela cultura no meio

YPR, apesar da maior fase lag observada. As velocidades de crescimento foram maiores para os meios Insect-XPRESS e SF900 II e menores para os meios YPR e HyQ SFX-Insect. Estudos realizados em biorreatores também mostraram que o meio YPR pode suportar altas densidades das células Sf9 e High Five.

Deparis e colaboradores (2003) testaram a utilização de um hidrolisado protéico de colza, vegetal bastante utilizado na produção de óleo (algumas variedades são mais conhecidas como canola), no crescimento das células de inseto Sf9 em meios livres de soro. Duas enzimas foram selecionadas para a hidrólise das proteínas presentes nesta planta, a Orientase 90N, que digere proteínas de uma maneira não específica, e a PTN 3.0 Special, que hidrolisa proteínas nos resíduos de aminoácidos alcalinos, como arginina e lisina. O hidrolisado obtido com a enzima Orientase 90N apresentou cerca de 66% (m/m) dos peptídeos com tamanho entre 1 e 10 KDa, enquanto que, no hidrolisado obtido através da enzima PTN 3.0 Special, 74% (m/m) dos peptídeos possuíam massa molar menor que 1 KDa. O cultivo das células Sf9 não foi possível na presença do hidrolisado obtido através da proteína PTN 3.0 Special. Já a suplementação do meio com o hidrolisado da enzima Orientase 90N teve apreciável efeito promotor do crescimento, aumentando em cerca de 60% a concentração celular máxima e em 30% a velocidade específica de crescimento celular. Uma comparação com a adição de lactoalbumina hidrolisada no meio livre de soro foi realizada, mostrando que, ao contrário do hidrolisado de colza, não ocorreu um aumento na densidade celular máxima atingida, apenas um prolongamento da fase estacionária.

Hidrolisados de arroz (Hy Pep 5115) e de trigo (Hy Pep 4605) também foram estudados por Ballez e colaboradores (2004), para o cultivo de células CHO produzindo interferon- γ recombinante. Em um cultivo em suspensão em biorreator, a adição de 2 g/L do hidrolisado de trigo a um meio livre de proteínas aumentou em 25% a densidade celular máxima e em 60% a secreção de interferon- γ , quando comparado com o cultivo no mesmo meio sem a adição do suplemento testado. O hidrolisado de arroz (1 g/L) foi testado em cultivos em microcarregadores em frascos agitados e em biorreator. A adição deste hidrolisado ao meio livre de proteínas ocasionou um aumento de 30% na secreção de interferon- γ em ambos os sistemas. Segundo os autores, o efeito positivo dos hidrolisados sobre a produção de interferon- γ não está apenas relacionado ao aumento da densidade celular, mas também a uma estimulação direta, já que houve aumento na produção

específica desta proteína. Além do efeito nutricional, peptídeos presentes nestes hidrolisados poderiam estar interagindo com receptores específicos da superfície celular relacionados ao crescimento, à sinalização anti-apoptótica ou à biossíntese de proteínas.

Estes trabalhos mostram a importância do estudo da composição de um meio de cultura e como a suplementação de um meio basal com os nutrientes adequados proporciona a obtenção de desempenho celular compatível com aqueles obtidos com os meios ricos livres de soro. Como mencionado anteriormente, há poucos dados na literatura sobre o cultivo das células S2 e a maioria dos trabalhos relata apenas a expressão de diferentes proteínas por estas células, o que ressalta a importância da realização de estudos sobre o metabolismo das células *Drosophila melanogaster* Schneider 2.

3.7. Biorreatores para o Cultivo Celular

A utilização de células animais para a obtenção de produtos biológicos iniciou-se na década de 1950 com a produção de vacinas humanas e animais, mas seu uso em larga escala tornou-se mais comum apenas a partir da década de 80, devido às tecnologias de DNA recombinante e de obtenção de hibridomas (Augusto e Oliveira, 2001).

Com isso, houve a necessidade de melhorias nas metodologias utilizadas, e as características particulares das células passaram a ser consideradas. As células de mamíferos são relativamente grandes, proliferam-se lentamente e são sensíveis ao cisalhamento. Além disso, conforme discutido anteriormente, algumas células animais dependem de suportes para se desenvolver, enquanto outras são independentes e podem crescer em suspensão. A concentração de produtos é geralmente muito baixa, e metabólitos tóxicos, como lactato e amônio, são produzidos durante o crescimento. Estas propriedades das células animais estabelecem algumas restrições quanto ao projeto de biorreatores. Certas características comuns destes reatores são descritas a seguir.

O reator deve ser suavemente aerado e agitado, pois altas taxas de aeração e agitação em geral podem causar danos às células por cisalhamento. Condições ambientais homogêneas e bem controladas e o fornecimento de ar enriquecido com CO₂, no caso de cultivo de células de mamíferos, devem ser promovidos. Se as células forem aderentes, o sistema deve apresentar material de suporte com elevada razão área-volume. Também é recomendável a remoção de produtos tóxicos do metabolismo.

A técnica preferida para a produção em larga escala de biofármacos provenientes de células animais é o cultivo homogêneo em reatores do tipo tanque agitado. As razões para isso são o maior controle do processo, que é possível com sistemas homogêneos, e a relativa facilidade de escalonamento. Muitas vezes, são feitas modificações nestes sistemas de cultura em suspensão para que estes fiquem adequados ao cultivo de células aderentes, como no caso de imobilização das células em microcarregadores. Projetos de biorreatores do tipo tanque agitado para células animais incluem o uso de biorreatores de fundo redondo, impelidores adequados e a prevenção de regiões de vórtice, que podem causar danos às células (van der Pol e Tramper, 1998).

Biorreatores com distintas geometrias podem ser empregados para o cultivo de células animais. Reatores de leito fixo, leito fluidizado e sistemas com fibras ocas são usados para células aderentes. Para células suspensas, são utilizados reatores de tanque agitado, do tipo *airlift* e de coluna de bolhas. Biorreatores de membranas e métodos de micro-encapsulação são utilizados para sistemas em contínuo, onde o cultivo celular, a concentração de produtos e a remoção de produtos tóxicos devem ser feitos simultaneamente. Quando as células são mantidas no reator, o meio fresco é adicionado contínua ou semi-continuamente e o meio processado é removido, o sistema é chamado de reator de perfusão. A retirada do meio processado remove os metabólitos tóxicos do sistema, reduzindo efeitos inibitórios (Shuler e Kargi, 1992).

O escalonamento do cultivo de células animais é mais facilmente realizado para culturas em suspensão que para células aderentes. As maiores alterações de escala para biorreatores que operam com células livres relacionam-se ao grau de controle ambiental requerido para a manutenção das condições adequadas para o crescimento celular, uma vez que o projeto do reator em si sofre, geralmente, poucas modificações. Isso se deve ao fato de que uma dorna de um litro de capacidade, por exemplo, pode ser considerada como conceitualmente similar a um biorreator de 1000 L, ou seja, o fator de aumento de escala não é muito elevado.

Em cultivos em larga escala, nos quais danos devido à agitação e à aeração podem ser causados às células animais, agentes protetores contra o cisalhamento são adicionados nas formulações de meios de cultura, principalmente naquelas livres de soro. Dentre os aditivos mais comumente utilizados estão alguns polímeros, como Pluronic F68,

metilcelulose e polietilenoglicol, e o soro fetal bovino. Dentre os polímeros, o Pluronic F68, um surfatante não iônico, é o mais utilizado para o cultivo de células de insetos e mamíferos (Palomares *et al.*, 2000). O Pluronic F68 tem massa molar de 8,4 KDa e apresenta concentração micelar crítica (CMC) de aproximadamente 9,2 g/L. O bloco central de poli-oxipropileno da molécula é hidrofóbico e os blocos de poli-oxietileno são hidrofílicos. A Figura 3.2 ilustra a estrutura química deste composto. Seu uso tem resultado em maior sobrevivência e concentração celular, particularmente em cultivos que empregam meios livres de soro ou em biorreatores, onde as células estão sujeitas a efeitos deletérios. Contudo, o uso deste composto ainda tem um caráter empírico e seu mecanismo de ação é ainda debatido (Palomares *et al.*, 2000).

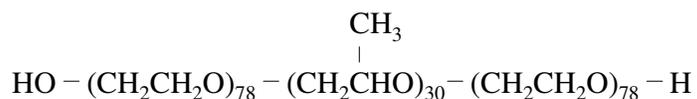


Figura 3.2. Estrutura química do Pluronic F68.

Nas culturas aeradas, a presença do Pluronic F68 minimiza a ligação das células às bolhas, diminuindo os danos celulares que ocorrem quando aquelas são carregadas até a superfície. Outros mecanismos propostos também incluem a estabilização da camada de espuma formada na região superior do reator e uma drenagem mais lenta do filme durante a ruptura da bolha. Este surfatante também tem efeito em culturas não aeradas, nas quais o dano celular ocorre devido aos vórtices formados, e a suplementação com Pluronic F68 reduz a tendência das células aderirem à nova superfície (van der Pol e Tramper, 1998; Palomares *et al.*, 2000).

O efeito protetor deste surfatante pode também estar relacionado à sua associação bioquímica à membrana celular, proporcionando sua estabilização. Experimentos mostram que, em presença de Pluronic F68, a viabilidade de hibridomas não é afetada com aumentos na intensidade da agitação (Chisti, 2000). O Pluronic F68 também tem a capacidade de reduzir a fluidez da membrana plasmática, e isto também pode estar relacionado a um possível mecanismo de proteção.

Com alto grau de pureza, o Pluronic F68 é adicionado ao meio de cultura em concentrações entre 0,5 e 3,0 g/L. O efeito protetor do surfatante é dependente da concentração, aumentando com ela, mas se estabilizando quando esta é de cerca de 0,5 g/L. Este composto deve ser esterilizado por filtração, pois a esterilização por vapor pode produzir peróxidos.

3.8. Cultivos da Linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2 em Biorreatores

Poucos trabalhos na literatura relatam o cultivo das células S2. Sondergaard (1996) realizou um cultivo de células S2 selvagens e transfectadas com o fator IX humano de coagulação sanguínea em biorreator de tanque agitado. O meio utilizado foi o meio Schneider suplementado com 10% de SFB. O volume do biorreator era de 2 litros, com aeração efetuada por tubos de silicone, agitação de 75 rpm e temperatura mantida em 25°C. A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 50%. A concentração do inóculo foi de $1,0 \times 10^6$ células/mL. O biorreator foi operado de dois modos, no modo batelada, no qual, após a concentração celular atingir o nível desejado, toda a suspensão era removida do fermentador, centrifugada, ressuspensa no mesmo volume de meio fresco e recolocada no fermentador para um novo período de crescimento; e no modo semi-batelada, onde 50 a 60% da suspensão celular era substituída por meio fresco quando a densidade celular atingia cerca de $1,5 \times 10^7$ células/mL, procedimento repetido em intervalos de 2 a 4 dias.

Em seus experimentos, Sondergaard observou que a menor concentração na qual uma cultura de células de *Drosophila melanogaster* pode ser iniciada sem apresentar fase lag em um biorreator é de $1,0 \times 10^6$ células/mL, e que esta fase lag pode estar relacionada à ausência de fatores de crescimento não conhecidos que são provavelmente secretados pelas células em crescimento.

Na operação em modo semi-batelada, foram realizadas 10 trocas de meio de 1 litro cada durante 36 dias. Observou-se que as velocidades de crescimento obtidas em cada período após a substituição do meio eram muito similares, indicando que não houve acúmulo de produtos tóxicos mesmo após um longo período de crescimento. Um total de $1,46 \times 10^{11}$ células foi obtido durante os 36 dias, o que equivale a 4×10^9 células/dia.

Os experimentos em modo batelada foram realizados com a linhagem S2 transfectada com o fator IX humano de coagulação sanguínea. Como foi observado, o

crescimento celular está fortemente relacionado à concentração de glicose no meio de cultura. Quando a glicose se torna escassa, o crescimento celular pára e o número de células cai se o meio de cultura não for substituído. A interrupção do crescimento celular é observada quando a concentração de glicose é menor que 0,25 g/L. A concentração de glutamina também foi monitorada e o mesmo efeito foi observado. Esta inibição do crescimento pode ser atribuída à baixa concentração de glicose ou glutamina, ou ao acúmulo de substâncias inibitórias liberadas pelas células mortas. Com a troca do meio de cultura, o crescimento celular pôde ser mantido e as células atingiram uma concentração de $5,7 \times 10^7$ células/mL. O rendimento deste experimento foi de $5,7 \times 10^{10}$ células em um período de 16 dias, o que equivale a $3,6 \times 10^9$ células/dia. A produção do fator IX, secretado no meio de cultura, acompanhou o perfil de crescimento celular.

Valle e colaboradores (2001) cultivaram células S2 transfectadas para a produção de menin humana, uma proteína que age como um potente supressor tumoral em neoplasia endócrina múltipla do tipo 1, em meio de cultura HyQ SFX, em frascos agitados e em reator de tanque agitado. Foram utilizados frascos de 250 mL agitados a 90 rpm e um fermentador com capacidade de 10 litros, também com agitação de 90 rpm. A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 30%. A concentração do inóculo foi de $1,0 \times 10^6$ células/mL. A melhor condição de indução da cultura para a expressão da proteína foi determinada a partir de um planejamento fatorial, no qual as variáveis independentes testadas foram a concentração celular no tempo de indução, a concentração de sulfato de cobre no tempo de indução e o tempo de coleta pós-indução.

No cultivo em frascos agitados, as células cresceram a uma velocidade de 0,03 a $0,04 \text{ h}^{-1}$ por quatro dias, atingindo uma concentração de $3,0 \times 10^7$ células/mL. Durante este período, as células consumiram glicose, glutamato e lactato, e a viabilidade manteve-se em 95% mesmo 100 horas após o início da fase estacionária. Amônio foi produzido lentamente durante a fase de crescimento e rapidamente consumido quando a fase estacionária foi atingida.

Com as condições de indução da produção de menin otimizadas, um cultivo foi realizado no biorreator de 10 litros. O fermentador foi inoculado com 2 litros de células provenientes de um biorreator de 2 litros de capacidade. O meio foi adicionado gradualmente, atingindo o volume final de 10 litros cerca de 150 horas após a inoculação.

A indução da expressão de menin com sulfato de cobre foi realizada quando a concentração de $1,2 \times 10^7$ células/mL foi atingida. Cerca de 1 a 2 mg de proteína por litro de cultura foram obtidos.

Assim, o escalonamento adequado do cultivo destas células, juntamente com a obtenção de um meio de cultura eficiente, pode levar a condições ótimas de crescimento e a uma produção expressiva de proteínas recombinantes.

3.9. Obtenção de Compostos Recombinantes através do Cultivo de Células de *Drosophila melanogaster*

Diversos trabalhos relatam o cultivo de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 modificadas geneticamente para a obtenção de proteínas recombinantes com atividades imunológicas e funcionais. Alguns destes estudos são brevemente discutidos a seguir e outros trabalhos estão apresentados na Tabela 3.4.

Culp e colaboradores (1991) estabeleceram uma cultura estável da linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2 geneticamente modificada para a expressão de uma forma truncada da proteína gp120 do envelope do HIV. As células foram cultivadas em meio M3 suplementado com 5 a 10% de soro fetal bovino. A proteína produzida apresentou-se altamente glicosilada, consistindo em uma cópia apropriada da proteína original, mostrando que estas células constituem um sistema estável para a produção eficiente de glicoproteínas complexas.

Dopamina β -hidroxilase (DBH) humana foi obtida a partir de células *Drosophila melanogaster* Schneider 2 transformadas geneticamente por Li e colaboradores (1996). As células S2 foram cultivadas em meio EX-CELL 400 livre de soro contendo 500 μ g/mL de higromicina B. A adição de 2,5% de soro fetal bovino era realizada caso as células não se mostrassem saudáveis. Os resultados mostraram que a DBH humana recombinante produzida pelas células S2 pode ser utilizada em substituição à DBH derivada de neuroblastomas humanos e que este sistema de expressão é uma fonte conveniente para a obtenção de grandes quantidades desta enzima.

Segundo Deml e colaboradores (1999a), células S2 transfectadas para a produção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) puderam ser cultivadas em meio

Drosophila Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de kanamicina e em meio livre de soro SF900 II suplementado com íons metálicos bivalentes e 1% de kanamicina, como alternativa ao uso de soro fetal bovino. Os níveis de HBsAg obtidos variaram bastante entre os diferentes clones, com a obtenção de até 7 µg/mL quando o meio livre de soro foi empregado.

Tabela 3.4. Trabalhos desenvolvidos enfocando o cultivo de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2, visando a produção de proteínas recombinantes e partículas virais.

Autores	Finalidade	Meio de Cultura
Benyajati e Dray, 1984	Expressão de genes de álcool desidrogenase	meio M3, 3% SFB
Gibson <i>et al.</i> , 1993	Expressão de dopamina β-hidroxilase	meio M3, 10% SFB
Millar <i>et al.</i> , 1995	Expressão do receptor acetilcolina muscarínico	meio M3, 12,5% SFB, 2 g/L extrato de levedura, 100 IU/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina
Tota <i>et al.</i> , 1995	Interação de [fluoresceína-Trp25]glucagon com o receptor de glucagon humano	meio Schneider, 10% SFB, 2 mM glutamina
Vanden Broeck <i>et al.</i> , 1995	Caracterização de um receptor	meio Schneider, 10% SFB, 50 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL streptomicina
Joanisse <i>et al.</i> , 1998	Clonagem e expressão de uma enzima nuclear	meio M3:D22 (1:1), 10% SFB
Deml <i>et al.</i> , 1999a	Expressão do antígeno de superfície do vírus da hepatite B	meio Schneider com 10% SFB ou meio SF900 sem íons metálicos bivalentes
Benting <i>et al.</i> , 2000	Expressão de proteínas (linhagem SL-3)	meio SF900 II, 1% SFB
Denault <i>et al.</i> , 2000	Caracterização de duas formas de SPC1 humana recombinante	meio DES Expression, 10% SFB, 2 mM glutamina
Lee <i>et al.</i> , 2000	Expressão de eritropoietina recombinante	meio M3, 10% IMS (suplemento para o cultivo de células de inseto)
Lehr <i>et al.</i> , 2000	Cromatografia para purificação de proteínas com cauda de histidina expressas em S2	meio DES Expression
Torfs <i>et al.</i> , 2000	Caracterização de STKR (receptor acoplado na proteína G de inseto)	meio Schneider, 0,6 g/L CaCl ₂ , 10% SFB

Tabela 3.4. Trabalhos desenvolvidos enfocando o cultivo de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2, visando a produção de proteínas recombinantes e partículas virais (cont.).

Autores	Finalidade	Meio de Cultura
Hill <i>et al.</i> , 2001	Expressão, purificação e caracterização do inibidor neuroserpin	meio Schneider, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomina, 4 mM glutamina, 10% SFB, 300 µg/mL higromicina B
Valle <i>et al.</i> , 2001	Produção e purificação de menin humana	meio HyQ SFX, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL anfotericina B, 10 µg/mL gentamicina, 200 µg/mL higromicina B
Van Poyer <i>et al.</i> , 2001	Ativação de adenilil ciclase	meio Schneider, 0,6 g/L CaCl ₂ , 0,4 g/L NaHCO ₃ , 10% SFB, 50 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL streptomina
Banks <i>et al.</i> , 2003	Clonagem e expressão de uma aminopeptidase	meio HyQ SFX
Jeon <i>et al.</i> , 2003	Expressão de tumstatina recombinante	meio M3, 10% IMS
Khaznadjji <i>et al.</i> , 2003	Expressão de hipodermina A funcional	meio DES Expression, 10% SFB
Kleditzsch <i>et al.</i> , 2003	Produção, purificação e caracterização de pro-CCK de rato	meio Drosophila-SFM contendo glutamina, penicilina/streptomina
Perret <i>et al.</i> , 2003	Expressão de um receptor opióide humano com cauda EGFP-amino	meio Insect-XPRESS, 10% SFB, 0,2% Pluronic F68, 50 µg/mL gentamicina
Shin <i>et al.</i> , 2003	Produção de interleucina-2 humana	meio M3, 10% IMS
Shin e Cha, 2003	Otimização da purificação de eritropoietina humana	meio M3, 10% IMS
Bachmann <i>et al.</i> , 2004	Purificação de cópias de partículas virais	meio IPL-41, 1% Pluronic F68, 1% concentrado lipídico, 2% yeastolate
Lim <i>et al.</i> , 2004	Expressão de transferrina humana funcional	meio M3 livre de soro
Prosise <i>et al.</i> , 2004	Produção de domínio de protease de ADAM33 humano	meio DES Expression, 0,3 mg/mL higromicina B, 0,1% Pluronic F68
Yokomizo <i>et al.</i> , 2007	Expressão da glicoproteína do vírus da raiva	meio SF900 II

Park e colaboradores (2001) conseguiram a expressão de endostatina recombinante a partir da linhagem *Drosophila melanogaster* S2 geneticamente modificada. As células foram cultivadas em meio M3 contendo 10% IMS (suplemento de meios para insetos) e

300 µg/mL de higromicina B, a 27°C. As células foram cultivadas por 7 dias na presença de cloreto de cádmio e butirato de sódio para avaliação de crescimento celular e expressão de endostatina. Os experimentos realizados mostraram que este sistema de expressão é eficiente para a produção de endostatina, com a obtenção de 18 mg/L, e pode ser usado como alternativa ao sistema de expressão baculovírus-células de inseto.

Yokomizo e colaboradores (2007) relataram a expressão da glicoproteína do vírus da raiva pelas células *Drosophila melanogaster* Schneider 2 modificadas geneticamente. As células, cultivadas em meio SF900 II, a 28°C, foram capazes de expressar cerca de 300 µg/L da glicoproteína com um alto grau de integridade física e biológica, mostrando que estas células podem ser bastante adequadas para a expressão deste produto. Análises em um citômetro de fluxo mostraram que cerca de 35% da população de células expressavam a proteína.

Como pode ser observado, diversos produtos já foram obtidos através do cultivo das células *Drosophila melanogaster* S2, e diferentes meios de cultura e suplementos foram empregados, o que mostra que o emprego desta linhagem celular é atrativo para a expressão de proteínas recombinantes e que um meio de cultura com uma composição adequada pode propiciar condições ótimas para o desenvolvimento desta linhagem.

3.10. Planejamento Experimental e seu Papel na Otimização de Meios de Cultura

A técnica de planejamento experimental é bastante adequada para a otimização de meios de cultura visando a obtenção de uma máxima produção de um composto de interesse. Os meios de cultura utilizados para o cultivo de células são extremamente complexos, com uma grande quantidade de nutrientes. O uso desta ferramenta permite, então, que pelo menos alguns de seus componentes sejam otimizados, proporcionando a elevação do rendimento, da produtividade, da pureza e da qualidade, com menores custos. Entretanto, deve-se levar em consideração que geralmente um grande número de ensaios é realizado simultaneamente e problemas ocorridos em um ensaio levam a uma necessidade de repetição de todo o experimento, o que pode ser um problema no caso do cultivo de células devido ao tempo dispendido na preparação de um experimento.

A metodologia de planejamento fatorial foi introduzida por Box na década de 1950 (Barros Neto *et al.*, 1995 e 2003; Rodrigues e Iemma, 2005), mas tem sido aplicada mais intensamente somente nos últimos anos devido à facilidade do uso de programas computacionais para análises estatísticas.

O planejamento experimental consiste na variação de todas as variáveis ao mesmo tempo, para que o efeito de interação que possa haver entre elas não seja desprezado, como muitas vezes acontece na análise univariável. Em um planejamento fatorial completo é necessária a realização de experimentos para todas as possíveis combinações dos valores extremos das faixas de variação escolhidas para cada variável. Neste planejamento, o número de variáveis é determinado por 2^n , onde n é o número de variáveis e, 2^n , o número de experimentos que serão realizados. Quando o número de variáveis é muito grande, pode-se realizar primeiramente uma triagem inicial das variáveis através da execução de um planejamento fatorial fracionário. Neste tipo de planejamento, pode-se verificar, com um menor número de experimentos, quais variáveis não são estatisticamente significativas e descartá-las na realização de um planejamento fatorial completo. Os modelos matemáticos obtidos, que correlacionam as variáveis independentes com as variáveis-resposta, são propostos com base em uma análise de variância (ANOVA) e permitem a construção de superfícies de resposta e a determinação das faixas ótimas de operação.

Com a utilização desta metodologia é possível avaliar os efeitos de diversas variáveis independentes sobre uma variável-resposta com um número reduzido de experimentos, de uma maneira mais racional e efetiva que as técnicas de tentativa e erro. O maior número de ensaios requerido pela análise univariável dificulta bastante a análise dos resultados, além de aumentar o tempo despendido e o gasto com materiais. Com o planejamento fatorial, efeitos de interação entre as variáveis independentes podem ser determinados e a otimização de várias respostas ao mesmo tempo pode ser realizada. No cultivo de células de inseto, esta técnica já foi empregada na seleção de alguns hidrolisados protéicos (Ikonomou *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2003; Ikonomou *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 2005).

3.11. Relevância da Raiva como Problema Mundial de Saúde Pública

A linhagem empregada neste trabalho foi transfectada para expressar a glicoproteína do vírus da raiva, visando a produção em larga escala desta proteína para a produção de vacinas. A raiva é um sério problema de saúde pública e causa de mortalidade em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento, estando associada a cerca de 55 mil mortes anuais (Organização Mundial de Saúde, 2007). Já a raiva que acomete os herbívoros é responsável por enormes prejuízos econômicos diretos. Na América Latina, o prejuízo é da ordem de 30 milhões de dólares por ano, sendo que no Brasil este valor se aproxima de 15 milhões de dólares, com a morte de cerca de 40.000 cabeças bovinas. Os prejuízos indiretos, no Brasil, estão calculados em 22,5 milhões de dólares (Instituto Pasteur, 2007).

O vírus da raiva (Figura 3.3) pertence ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*. Tem a forma de um projétil e mede aproximadamente 180 nm de comprimento por 75 nm de largura. Seu genoma consiste em fita única de RNA que codifica cinco proteínas, a nucleoproteína principal N, a fosfoproteína NS, a RNA polimerase L, a matriz protéica e a glicoproteína de superfície. As proteínas N, NS e L, juntamente com o RNA viral formam o complexo ribonucleoprotéico. A glicoproteína de superfície é um antígeno capaz de induzir anticorpos que neutralizam o vírus, conferindo imunidade contra a raiva. Além da glicoproteína, o complexo ribonucleoprotéico, componente estrutural primário de superfície presente no envelope viral, também é capaz de induzir imunidade (Fu *et al.*, 1991). O vírus da raiva é estável entre pH 3 e pH 11 e pode sobreviver por muitos anos a baixas temperaturas. É rapidamente inativado por desidratação, exposição a raios X e ultravioleta, luz solar, tripsina, b-propiolactona, éter e detergentes.

A raiva é uma zoonose e a infecção humana ocorre geralmente através de mordidas e arranhões de animais infectados, como cães, gatos, morcegos, raposas e lobos, dentre outros. O vírus liga-se primeiramente a receptores nas células musculares, mas é altamente neurotrópico durante o restante da infecção. Geralmente, o período de incubação é inversamente relacionado ao tamanho do inóculo, grau de inervação e proximidade da mordida ao sistema nervoso central. Com extremos de quatro dias a muitos anos, o período de incubação varia geralmente entre 20 e 90 dias.

Os sintomas iniciais da raiva são geralmente o acometimento dos sistemas respiratório, gastrointestinal e nervoso central. Quando o vírus se espalha no sistema

nervoso central, uma encefalite progressiva se desenvolve. A doença é quase sempre fatal e, sem tratamento intensivo, os pacientes morrem em poucos dias. Para a prevenção de mortes, o tratamento deve ser iniciado antes que o vírus atinja o sistema nervoso central e os sintomas clínicos apareçam. Um tratamento pós-exposição iniciado no estágio inicial usando vacina anti-rábica em combinação com soro anti-rábico pode ser muito efetivo na prevenção da morte. O tratamento pré-exposição é indicado apenas para pessoas que moram ou viajam para regiões onde a raiva é um grande problema ou que estão expostas a este vírus devido à sua ocupação, e apenas as vacinas mais modernas podem ser aplicadas.

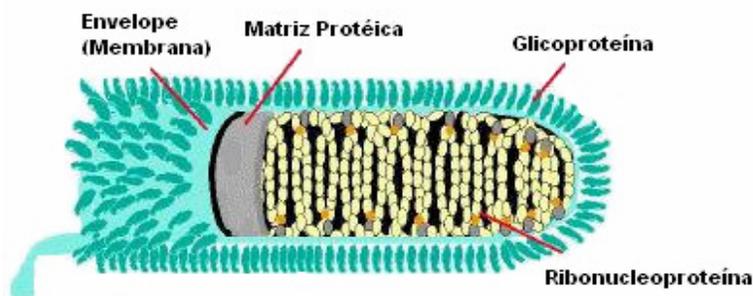


Figura 3.3. Vírus rábico (adaptada de Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2007).

A primeira vacina anti-rábica foi desenvolvida por Louis Pasteur e colaboradores em 1885, utilizando tecido medular desidratado extraído de um coelho infectado. A partir disso, vários tipos de vacinas têm sido desenvolvidos e empregados. As vacinas da primeira geração são produzidas utilizando-se substrato animal para obtenção da massa viral. Estas vacinas têm sido largamente utilizadas em humanos e animais. Podem ser produzidas empregando-se tecidos nervosos de animais adultos (carneiros, cabras), ovos embrionados (patos, galinhas) e cérebro de animais lactentes como camundongos e ratos (Pérez e Paolazzi, 1997). As vacinas produzidas com tecido nervoso de animais adultos são consideradas de baixo custo, mas possuem uma potência relativamente baixa por dose, e, apesar de aprimoradas nos últimos anos, podem causar sérias reações adversas, como meningoencefalite, meningoencefalomielite e paralisia, dentre outras. Já as vacinas obtidas

com ovos embrionados e cérebro de animais lactentes são mais seguras (Pérez e Paolazzi, 1997).

A segunda geração inclui vacinas obtidas com o cultivo de células, que começaram a ser produzidas a partir de 1930. Estas vacinas podem ser classificadas em três grupos, de acordo com o sistema empregado para sua produção. O primeiro grupo inclui vacinas produzidas com o cultivo de células primárias de mamíferos (células renais de hamster, cachorro e feto bovino), ou com o cultivo de células de aves (embriões de galinha). No segundo grupo estão as vacinas produzidas com células diplóides, principalmente de origem humana, e, no terceiro grupo, vacinas desenvolvidas com células heteroplóides, como as células Vero (Pérez e Paolazzi, 1997). Estas vacinas são consideradas seguras e imunogênicas.

Atualmente há um grande interesse na produção de vacinas através da utilização da tecnologia de DNA recombinante. Diferentes sistemas de expressão como células procarióticas, leveduras, células de mamíferos, de insetos e de vegetais têm sido utilizados para a produção de uma vacina efetiva, segura e de baixo custo. Neste trabalho, a linhagem utilizada é uma linhagem de inseto, *Drosophila melanogaster* Schneider 2, que foi transfectada para a expressão da glicoproteína do vírus da raiva.

A linhagem *Drosophila melanogaster* S2 selvagem, desenvolvida originalmente por Schneider (1972), foi co-transfectada com o vetor de expressão constitutiva pAc5.1/V5 His-A, contendo o gene GPV/PV (pAc/GPV), juntamente com o vetor de seleção pCoHygro, que confere resistência ao antibiótico higromicina, dando origem à linhagem S2AcGPV2 (Yokomizo, 2007), que expressa a glicoproteína do vírus da raiva. Segundo Yokomizo (2007), esta linhagem é bastante heterogênea, com populações que expressam diferentes níveis de proteína. Esta heterogeneidade é atribuída à etapa de clonagem celular, visto que estas células apresentam crescimento limitado quando em baixa concentração, o que dificulta a obtenção de clones puros. Cultivos realizados em meio SF900 II mostram que as culturas atingem altas concentrações celulares, e ensaios de imunofluorescência indicam que a glicoproteína expressa na membrana celular mantém a conformação trimérica ocorrente no vírus rábico, conformação esta que confere imunogenicidade à proteína, o que torna o sistema em estudo especialmente atraente para a finalidade em questão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagem Celular

As linhagens de células *Drosophila melanogaster* Schneider 2 selvagem (S2) (Invitrogen) e S2 transfectada para a produção da glicoproteína do vírus da raiva (S2AcGPV2) (Yokomizo, 2007) foram obtidas no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira, a um número de passagens desconhecido. Como mencionado anteriormente, a linhagem modificada geneticamente é composta por uma população heterogênea com células que expressam diferentes níveis da glicoproteína do vírus da raiva (GPV). Esta heterogeneidade deve-se à dificuldade de clonagem destas células, já que elas não se desenvolvem em baixa concentração.

4.1.2. Meios de Cultura e Nutrientes

Os meios de cultura comerciais empregados foram o meio livre de soro SF900 II (Gibco BRL) e os meios basais TNM-FH, preparado a partir do meio Grace (Gibco BRL) com a adição de 3,33 g/L de *yeastolate* (Gibco BRL), 3,33 g/L de lactoalbumina hidrolisada e 10% de soro fetal bovino (Cultilab), e o meio TC100 (Cultilab) com a adição de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab).

Os suplementos empregados foram *yeastolate* (Gibco BRL), lactoalbumina hidrolisada (Becton, Dickinson and Co.), concentrado lipídico quimicamente definido (composto por Pluronic F68, Tween 80, ácidos graxos, tocoferol e colesterol) (Gibco BRL), soro fetal bovino (Cultilab), Hy Soy (Sigma), Pluronic F68 (Sigma Chemical Co.), além de glicose (Sigma Chemical Co.) e glutamina (Sigma Chemical Co.). O concentrado protéico de soro de leite (CPSL) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri (Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp).

4.2. Métodos

4.2.1. Manutenção e Propagação da Linhagem Celular

As células selvagens e transfectadas estavam originalmente adaptadas ao meio SF900 II e foram mantidas neste meio de cultura. Após adaptação, as células também foram mantidas em meio basal TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino. O cultivo foi realizado em garrafas plásticas de cultura tipo T-25 e em frascos do tipo *schott*. Os repiques foram feitos a cada 3 ou 4 dias, mantendo-se uma concentração celular inicial de cerca de 1×10^6 células viáveis/mL.

4.2.2. Preservação da Linhagem Celular

Para a preservação das linhagens, as células, na fase exponencial de crescimento, eram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O *pellet* obtido era ressuspensionado em meio de congelamento, composto por 40% de meio fresco, 50% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck), para a obtenção de uma suspensão contendo cerca de 1×10^7 células viáveis/mL. As amostras foram então transferidas para tubos de criogenia, que foram armazenados primeiramente em um freezer a -80°C por 24 horas e, em seguida, transferidos para um reservatório de criopreservação contendo nitrogênio líquido.

Quando necessário, na etapa de descongelamento, as células foram descongeladas rapidamente a 37°C e o conteúdo do criotubo transferido para um tubo cônico. Após a adição de cerca de 10 mL de meio fresco de maneira lenta, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em 5 mL de meio fresco. A suspensão foi então transferida para uma garrafa de cultura T-25.

4.2.3. Adaptação das Linhagens S2 selvagem e S2AcGPV2 a Meios Basais e Cinéticas de Crescimento nos Meios SF900 II e TC100 (Ensaio AD-1, AD-2, AD-3, CIN-1 e CIN-2)

A adaptação das células, originalmente cultivadas no meio livre de soro SF900 II, a meios basais (TNM-FH e TC100) suplementados com soro fetal bovino foi necessária para que fosse possível o desenvolvimento da etapa de formulação do meio de cultura.

Tentativas foram realizadas reduzindo-se gradualmente o percentual do meio SF900 II nas culturas, ou com a passagem direta das células do meio SF900 II para os meios mais pobres. As tentativas foram realizadas em cultivos estáticos, empregando-se garrafas de cultura T-25. Em todas as adaptações realizadas neste trabalho, sucessivas passagens foram realizadas até que a curva e a velocidade de crescimento se tornassem reprodutíveis.

Como não foi possível a adaptação destas linhagens ao meio TNM-FH, o comportamento das células S2 selvagem e S2AcGPV2 foi avaliado apenas no meio livre de soro SF900 II e no meio TC100 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Os ensaios foram realizados em frascos *schott*, com concentrações de inóculo de 5 e 10×10^5 células viáveis/mL, e com monitoramento do crescimento celular, dos consumos de glicose e glutamina e da produção de lactato.

4.2.4. Formulação de Diferentes Meios de Cultura

Em todos os ensaios em que diferentes formulações de meios de cultura foram testadas, a linhagem de células utilizada foi a S2AcGPV2, já que um dos objetivos deste trabalho é a produção da glicoproteína do vírus da raiva. A concentração de inóculo empregada foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL, proveniente de uma cultura adaptada em meio TC100 suplementado com 10% (v/v) de SFB, contendo 10 g/L de glicose e 3,5 g/L de glutamina (concentrações finais).

O meio base empregado em todos os estudos de formulação, no qual foram adicionadas diferentes concentrações dos diversos suplementos avaliados, era composto pelo meio basal TC100 contendo 10 g/L de glicose, 3,5 g/L de glutamina e 0,1% (m/v) de Pluronic F68 (como protetor contra o cisalhamento celular). Ressalta-se que as concentrações de glicose e glutamina foram selecionadas com base na composição do meio SF900 II, para garantir que estes nutrientes, considerados limitantes de crescimento (Drews *et al.*, 1995; Mendonça *et al.*, 1999), não se esgotassem precocemente durante o cultivo celular. Em todos os ensaios, as células foram cultivadas em frascos tipo *schott*, e os dados obtidos foram tratados no programa computacional Statistica 5.0, adotando-se como limite de confiança mínimo o valor de 90%.

4.2.4.1. Avaliação da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, *Yeastolate*, Lactoalbumina Hidrolisada e Soro Fetal Bovino sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-1)

Os efeitos das variáveis percentual de concentrado protéico de soro de leite (CPSL) (1 a 3% m/v), concentração de *yeastolate* (1 a 8 g/L), concentração de lactoalbumina hidrolisada (1 a 4 g/L) e percentual de SFB (1 a 3% v/v) foram avaliados sobre o crescimento e a viabilidade celular, empregando-se um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , como mostrado na Tabela 4.1. Todos os suplementos foram adicionados sobre o meio base, e seus níveis de variação para as variáveis independentes foram propostos de acordo com a análise de literatura pertinente.

Tabela 4.1. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com quatro replicatas no ponto central (formulação 9) para avaliação dos efeitos da adição de CPSL, *yeastolate*, lactoalbumina hidrolisada e SFB no meio base (ensaio PF-1).

Meio	CPSL (%)	<i>Yeastolate</i> (g/L)	Lactoalbumina (g/L)	SFB (%)
1	1	1	1	1
2	3	1	1	3
3	1	8	1	3
4	3	8	1	1
5	1	1	4	3
6	3	1	4	1
7	1	8	4	1
8	3	8	4	3
9	2	4,5	2,5	2

4.2.4.2. Avaliação da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, Emulsão Lipídica e Soro Fetal Bovino sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-2)

A partir dos resultados obtidos no experimento anterior, realizou-se um planejamento completo 2^3 com 4 replicatas no ponto central (Tabela 4.2) para o estudo dos efeitos do concentrado protéico de soro de leite (0,1 a 1% m/v), do SFB (0,5 a 3% v/v) e de uma mistura lipídica (1 a 5% v/v) sobre o crescimento e a viabilidade celular. Além da suplementação do meio base com estes suplementos, também foram adicionados aos ensaios lactoalbumina hidrolisada (3,3 g/L) e *yeastolate* (8 g/L).

Tabela 4.2. Planejamento fatorial fracionário 2^3 com quatro replicatas no ponto central (formulação 18) para avaliação dos efeitos da adição de CPSL, SFB e de uma emulsão lipídica no meio base enriquecido com lactoalbumina hidrolisada e *yeastolate* (ensaio PF-2).

Meio	CPSL (%)	SFB (%)	Lipídio (%)
10	0,1	0,5	1
11	1	0,5	1
12	0,1	3	1
13	1	3	1
14	0,1	0,5	5
15	1	0,5	5
16	0,1	3	5
17	1	3	5
18	0,55	1,75	3

4.2.4.3. Avaliação da Adição de *Yeastolate*, Soro Fetal Bovino e Emulsão Lipídica sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-3)

Como o concentrado protéico de soro de leite não se mostrou como um bom suplemento para o cultivo destas células, um outro planejamento completo 2^3 com 4 replicatas no ponto central para o estudo dos efeitos do *yeastolate* (1 a 8 g/L), do SFB (1 a 3% v/v) e de uma emulsão lipídica (1 a 5% v/v) sobre o crescimento e a viabilidade celular foi realizado. Além destes componentes, também foram adicionados 3,3 g/L de lactoalbumina hidrolisada no meio base. Os ensaios realizados estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Planejamento fatorial fracionário 2^3 com quatro replicatas no ponto central (formulação 27) para avaliação dos efeitos da adição de *yeastolate*, SFB e de uma emulsão lipídica no meio base enriquecido com lactoalbumina hidrolisada (ensaio PF-3).

Meio	<i>Yeastolate</i> (g/L)	SFB (%)	Lipídio (%)
19	1	1	1
20	8	1	1
21	1	3	1
22	8	3	1
23	1	1	5
24	8	1	5
25	1	3	5
26	8	3	5
27	4,5	2	3

4.2.4.4 Avaliação da Adição de *Yeastolate* e Soro Fetal Bovino sobre o Crescimento e a Viabilidade das Células S2AcGPV2 (Ensaio PF-4)

Com os resultados obtidos no experimento anterior, realizou-se um planejamento completo 2^2 com 3 replicatas no ponto central para o estudo dos efeitos do *yeastolate* (1 a 3

g/L) e do SFB (1 a 3% v/v) sobre o crescimento e a viabilidade das células S2AcGPV2 (Tabela 4.4). Além disso, também foi adicionado ao meio base 1% (v/v) de emulsão lipídica.

Tabela 4.4. Planejamento fatorial fracionário 2^2 com três replicatas no ponto central (formulação 32) para avaliação dos efeitos da adição de *yeastolate* e SFB no meio base enriquecido com emulsão lipídica (ensaio PF-4).

Meio	<i>Yeastolate</i> (g/L)	SFB (%)
28	1	1
29	3	1
30	1	3
31	3	3
32	2	2

4.2.5. Adaptação, Crescimento Celular e Expressão do Produto em Meios Formulados Selecionados (Ensaio CIN-3)

Com os bons resultados obtidos com o ensaio realizado segundo planejamento fatorial completo 2^2 , as células S2AcGPV2 foram adaptadas aos diferentes meios formulados naquele ensaio. Após as adaptações, cinéticas de crescimento foram realizadas e os resultados foram comparados ao desempenho das células nos meios SF900 II e TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino. A concentração de inóculo empregada foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL e os ensaios foram realizados em duplicata, em frascos agitados tipo *schott*. As formulações de meio de cultura são as mesmas do ensaio descrito no item 4.2.4.4 e estão apresentadas na Tabela 4.4.

Um outro cultivo das células S2AcGPV2 nas formulações 28 a 32 e nos meios TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino e SF900 II foi realizado para verificar se as células estavam expressando a glicoproteína do vírus da raiva. O ensaio foi realizado em garrafas T-25, a concentração de inóculo empregada foi de $7,5 \times 10^5$ células/mL, e

amostras para dosagem foram retiradas no 5º dia de cultivo. A metodologia de preparo e armazenamento das amostras está descrita no item 4.2.13.5.

4.2.6. Remoção do Soro Fetal Bovino dos Meios de Cultura e Suplementação com Variadas Concentrações de *Yeastolate* (Ensaio CIN-4)

Com a adequada adaptação das células aos meios com pequena concentração de soro fetal bovino, realizou-se um ensaio em que este composto não foi adicionado ao meio de cultura e o *yeastolate* foi suplementado em concentrações que variaram de 1 a 7 g/L. O meio de cultura era composto pelo meio base suplementado com emulsão lipídica (1% v/v). O inóculo foi preparado a partir de células adaptadas à formulação 28 do ensaio anterior e a concentração utilizada foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL. Os ensaios foram realizados em frascos do tipo *schott*.

4.2.7. Efeito da Adição do Hidrolisado de Soja Hy Soy como Substituto do Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-5)

O efeito da adição de um outro suplemento no crescimento das células S2AcGPV2 foi avaliado e, para uma comparação direta com os resultados obtidos com a adição de *yeastolate*, um ensaio similar ao anterior foi realizado. Diferentes concentrações de Hy Soy foram testadas (1 a 7 g/L) e, como no ensaio anterior, soro fetal bovino não foi adicionado. O meio de cultura era composto pelo meio base suplementado com 1% (v/v) de emulsão lipídica. Para a preparação do inóculo foram utilizadas células adaptadas à formulação 28, e a concentração celular utilizada foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL. Os ensaios foram realizados em frascos do tipo *schott*.

4.2.8. Adaptação e Crescimento Celular na Formulação de Meio de Cultura Encontrada como a mais Adequada para o Crescimento das Células S2AcGPV2 (Ensaio CIN-6)

Após a avaliação dos suplementos *yeastolate* e Hy Soy, as células S2AcGPV2 foram adaptadas ao meio de cultura que proporcionou um melhor resultado em relação ao crescimento celular e cinéticas para avaliação do crescimento celular, consumo de glicose,

produção de lactato e expressão de proteína foram realizadas. A concentração de inóculo empregada foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL e os ensaios foram realizados em frascos agitados tipo *schott*. O meio de cultura empregado foi aquele escolhido como a formulação mais adequada para o cultivo das células S2AcGPV2, formulado com o meio base contendo 1% (v/v) de emulsão lipídica e 3 g/L de *yeastolate*.

4.2.9. Ensaios em Biorreator (Ensaios RE-1, RE-2 e RE-3)

Para avaliar o crescimento celular em maior escala, foram realizados ensaios em biorreator. A formulação utilizada foi o meio TC100 suplementado com 3 g/L de *yeastolate*, 10 g/L de glicose, 3,5 g/L de glutamina, 1% (v/v) de emulsão lipídica e 0,1% (m/v) de Pluronic F68. Foram realizados três ensaios em condições distintas indicadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Diferenças entre os ensaios realizados em biorreator.

Ensaio	Tipo de pá	Velocidade de agitação (rpm)	Oxigênio dissolvido (%)	Ar
RE-1	turbina tipo Rushton com 6 pás	150	40	compressor odontológico
RE-2	turbina tipo Rushton com 6 pás	100	40	compressor odontológico
RE-3	turbina tipo <i>pitched blade</i> com 2 pás	50 (até 6,5 h) 75 (até 69,5 h) 90 (restante)	30	sintético medicinal

Nos dois primeiros ensaios, o controle de oxigênio foi realizado empregando-se ar atmosférico comprimido através de compressor odontológico (Barionkar, modelo EL 20750), nitrogênio ultra-puro (White Martins) e oxigênio ultra-puro (White Martins). Já a agitação foi realizada através do emprego de um elemento de agitação com duas turbinas tipo Rushton com 6 pás cada, proporcionando um fluxo radial no biorreator. No último ensaio, ar sintético medicinal (Air Liquide), nitrogênio ultra-puro (Air Liquide) e oxigênio

ultra-puro (White Martins) foram utilizados. O elemento de agitação empregado (fluxo axial) continha duas turbinas tipo *pitched blade* com 2 pás cada e ângulo de 45°.

4.2.10. Avaliação de Diferentes Concentrações de Pluronic F68 (Ensaio CIN-7)

Com a observação de que o crescimento das células em biorreator era inferior ao verificado em frascos *schott*, realizou-se um ensaio em frascos agitados tipo *schott* empregando-se diferentes concentrações de Pluronic F68 (0,1 a 0,6% m/v) para avaliar preliminarmente qual a maior concentração deste suplemento que poderia ser utilizada sem causar toxicidade às células S2AcGPV2. A concentração de inóculo empregada foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL. O meio de cultura empregado foi o meio base suplementado com 1% (v/v) de emulsão lipídica e 3 g/L de *yeastolate*.

4.2.11. Ensaio em Biorreator com Aumento da Concentração de Pluronic F68 (Ensaio RE-4 e RE-5)

Após a avaliação das diferentes concentrações de Pluronic F68 no crescimento das células S2AcGPV2, realizaram-se ensaios em biorreator nos quais a concentração deste surfatante foi aumentada para 0,3% e 0,6% (m/v). O meio de cultura empregado apresentou a formulação anteriormente explicitada. Utilizou-se o elemento de agitação de fluxo axial com duas turbinas tipo *pitched blade* com 2 pás cada e ângulo de 45°, agitação de 90 rpm. A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 30% com nitrogênio ultra-puro e oxigênio ultra-puro, ambos da White Martins, ar sintético medicinal (White Martins) no ensaio contendo 0,3% de Pluronic F68 e ar atmosférico no ensaio contendo 0,6% deste surfatante.

4.2.12. Sistemas de Cultivo

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram empregados diferentes sistemas de cultivo, como garrafas de cultura T-25, frascos agitados tipo *schott* e biorreator. Nos ensaios realizados de maneira estática, as garrafas de cultura, com volume de trabalho de 5 mL, foram mantidas em estufa a uma temperatura de 28°C. Os frascos tipo *schott* empregados, com 100 mL de capacidade e 20 mL de volume de trabalho, foram mantidos

em incubadora rotativa (New Brunswick Scientific, Innova 4230), com agitação de 100 rpm e temperatura também de 28°C. O volume de trabalho foi definido em 20 mL para minimizar o efeito da redução do volume de meio com a retirada de amostras, quando necessário, para dosagens de nutrientes, metabólitos e produto. Já os ensaios em maior escala, foram realizados no biorreator Biostat MD (B. Braun) com capacidade de 2 litros e volume de trabalho de 1,5 litros. A aeração foi realizada através de mangueira de silicone (Si-Schlauch), com $3,00 \pm 0,20$ mm de diâmetro e $0,35 \pm 0,15$ mm de espessura da parede. O comprimento total da mangueira era de 5 m, e cerca de 3,5 m estavam submersos. A temperatura foi controlada em 28°C.

Nos ensaios realizados em frascos *schott* e em reator, amostras eram retiradas e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante era coletado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de glicose, lactato, glutamina, amônio e proteína.

A Figura 4.1 apresenta um diagrama com a seqüência dos ensaios realizados durante o desenvolvimento deste trabalho, e a Tabela 4.6 apresenta um resumo das condições de cultivo empregadas em cada um deles.

4.2.13. Métodos Analíticos

4.2.13.1. Monitoramento do Crescimento e Viabilidade Celular

A morfologia, concentração e a viabilidade celular foram monitoradas através de microscopia ótica. A concentração de células mortas foi estimada pelo método de exclusão de azul de Trypan (0,05%), que tem como fundamento o fato de que células mortas absorvem o corante devido a falhas na membrana celular, enquanto células vivas impedem sua entrada, permanecendo descoloridas (Freshney, 1994).

4.2.13.2. Determinação das Concentrações de Glicose, Lactato e Glutamina no Meio de Cultura

As concentrações de glicose, lactato e glutamina presentes nos sobrenadantes das culturas realizadas em frascos *schott* foram determinadas através do analisador bioquímico Yellow Spring Instruments modelo 2700.

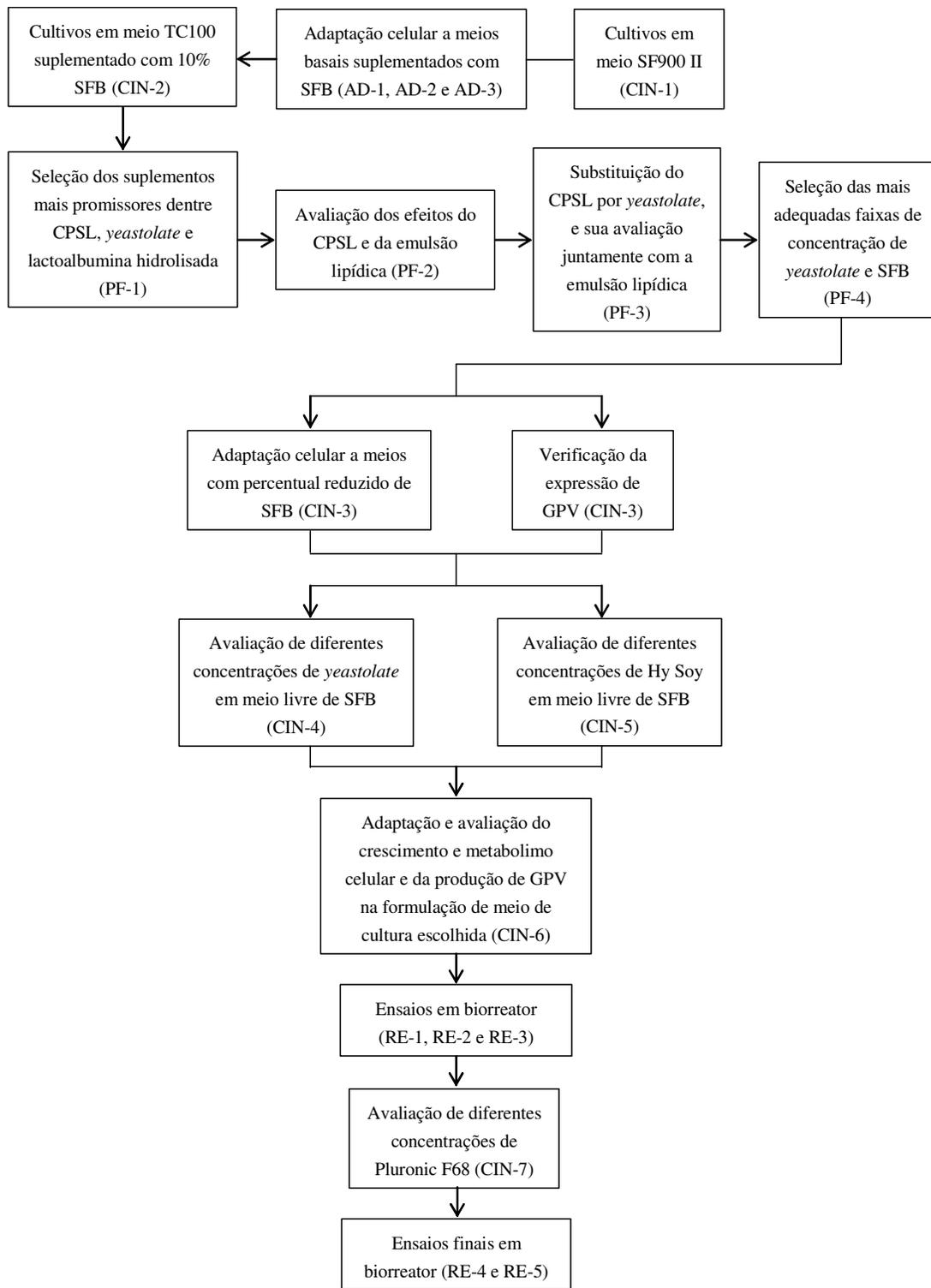


Figura 4.1. Fluxograma de blocos indicativo dos ensaios realizados.

Tabela 4.6. Resumo das condições experimentais utilizadas nos ensaios realizados.

Ensaio	Descrição	Linagem	Meio de cultura	Concentração de inóculo (células/mL)	Sistema de cultivo
AD-1	Adaptação	S2	TNM-FH com 10% SFB	0,5 a 2×10^6	garrafas T25, temperatura 28°C
AD-2			TC100 com 10% SFB	1,5 e 2×10^6	
AD-3		S2AcGPV2	TC100 com 10% SFB	2×10^6	
CIN-1	Cinética de crescimento	S2 e	SF900 II	5 e 10×10^5	frascos tipo <i>schott</i> (100 mL de capacidade e 20 mL de volume de trabalho), mantidos em incubadora rotativa, com agitação de 100 rpm e temperatura de 28°C
CIN-2		S2AcGPV2	TC100 com 10% SFB	5 e 10×10^5	
PF-1	Avaliação de CPSL, <i>yeastolate</i> , lactoalbumina hidrolisada e SFB	S2AcGPV2	meio TC100 contendo glicose, glutamina e Pluronic F68	$7,5 \times 10^5$	
PF-2	Avaliação de CPSL, SFB e emulsão lipídica		meio TC100 contendo glicose, glutamina, lactoalbumina hidrolisada, <i>yeastolate</i> e Pluronic F68		
PF-3	Avaliação de <i>yeastolate</i> , SFB e emulsão lipídica		meio TC100 contendo glicose, glutamina, lactoalbumina hidrolisada e Pluronic F68		
PF-4	Avaliação de <i>yeastolate</i> e SFB		meio TC100 contendo glicose, glutamina, emulsão lipídica e Pluronic F68		
CIN-3	Cinética de crescimento nos meios formulados no ensaio PF-4		meios 28 a 32, TC100 com 10% SFB e SF900 II		
CIN-4	Avaliação de diferentes concentrações de <i>yeastolate</i> em meio livre de soro		meio TC100 contendo glicose, glutamina, emulsão lipídica e Pluronic F68		
CIN-5	Avaliação de diferentes concentrações de Hy Soy em meio livre de soro		meio TC100 contendo glicose, glutamina, emulsão lipídica e Pluronic F68		
CIN-6	Cinética de crescimento na formulação de meio de cultura escolhida		meio TC100 contendo 10 g/L glicose, 3,5 g/L glutamina, 1% (v/v) emulsão lipídica, 3 g/L <i>yeastolate</i> e 0,1% (m/v) Pluronic F68		

Tabela 4.6. Resumo das condições experimentais utilizadas nos ensaios realizados (cont.).

Ensaio	Descrição	Linagem	Meio de cultura	Concentração de inóculo (células/mL)	Sistema de cultivo
RE-1	Ensaio em biorreator	S2AcGPV2	meio TC100 contendo 10 g/L glicose, 3,5 g/L glutamina, 1% (v/v) emulsão lipídica, 3 g/L <i>yeastolate</i> e 0,1% (m/v) Pluronic F68	7,5x10 ⁵	turbina fluxo radial, agitação 150 rpm, 40% O ₂ dissolvido, ar de compressor odontológico, 28°C
RE-2					turbina fluxo radial, agitação 100 rpm, 40% O ₂ dissolvido, ar de compressor odontológico, 28°C
RE-3					turbina fluxo axial, agitação 50 a 90 rpm, 30% O ₂ dissolvido, ar medicinal, 28°C
CIN-7	Avaliação de diferentes concentrações de Pluronic F68		meio TC100 contendo 10 g/L glicose, 3,5 g/L glutamina, 1% (v/v) emulsão lipídica e 3 g/L <i>yeastolate</i>		frascos tipo <i>schott</i> (100 mL de capacidade e 20 mL de volume de trabalho), mantidos em incubadora rotativa, com agitação de 100 rpm e temperatura de 28°C.
RE-4	Ensaio em biorreator		meio TC100 contendo 10 g/L glicose, 3,5 g/L glutamina, 1% (v/v) emulsão lipídica, 3 g/L <i>yeastolate</i> e 0,3% (m/v) Pluronic F68		biorreator, turbina fluxo axial, agitação 90 rpm, 30% O ₂ dissolvido, ar medicinal, 28°C
RE-5	Ensaio em biorreator	meio TC100 contendo 10 g/L glicose, 3,5 g/L glutamina, 1% (v/v) emulsão lipídica, 3 g/L <i>yeastolate</i> e 0,6% (m/v) Pluronic F68	biorreator, turbina fluxo axial, agitação 90 rpm, 30% O ₂ dissolvido, ar medicinal, 28°C		

Já nos cultivos em biorreator, empregou-se o método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a dosagem de glicose e lactato. Em ambos os casos, as amostras passaram primeiramente por um processo de desproteinização antes da realização das análises. Para 1 mL de amostra, adicionou-se 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 240 g/L ($C_2HCl_3O_2$) e 800 µL de H_2O Milli Q. Após homogeneizadas, as amostras foram então centrifugadas a 10000 rpm e 4°C, por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para tubos apropriados ao injetor do equipamento. Uma curva de calibração foi obtida a partir da diluição sucessiva da solução padrão de glicose (3,0 g/L).

A dosagem de glicose foi realizada pelo método de cromatografia líquida HPLC, através de um equipamento fabricado pela WATERS, composto de bomba modelo 510, detector de índice de refração modelo 410, injetor automático modelo 717 e integrador modelo 746. As amostras foram injetadas automaticamente (10 µL) e passavam por uma pré-coluna Shodex SC1011P e por uma coluna Shodex SC1011. A temperatura do forno da coluna era de 72°C e a fase móvel era constituída de uma solução de EDTA/ Ca^{2+} na concentração de 0,187 g/L, preparada em água Milli Q (0,6 mL/min). Uma curva de calibração foi obtida a partir da diluição sucessiva da solução padrão de glicose (3,0 g/L).

Para a dosagem de lactato, um equipamento da WATERS, composto de bomba modelo 600 E, detector de índice de refração modelo 410, injetor Rheodyne modelo 7725i, com loop de 20 µL e integrador Water 746, foi utilizado. As amostras foram injetadas manualmente (20 µL) e passavam por uma pré-coluna Shodex SH1011P e por uma coluna Shodex SH1011. A temperatura do forno da coluna era de 55°C e a fase móvel utilizada foi uma solução de H_2SO_4 0,1N, a uma vazão de 1,0 mL/min. A curva de calibração foi obtida a partir da diluição sucessiva de uma solução padrão de lactato (3,0 g/L).

4.2.13.3. Determinação da Concentração de Amônio

Para determinar a concentração de amônio utilizou-se um eletrodo específico (Analyser, modelo ORION 95-12) e um potenciômetro (Procyon, modelo SA720). Este eletrodo detecta variações logarítmicas de mili-voltagem que ocorrem com a conversão de amônio em amônia, em solução. Antes da dosagem, preparou-se uma curva de calibração,

utilizando as soluções padrões de sulfato de amônio em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm).

4.2.13.4. Determinação das Osmolalidades dos Meios de Cultura

A osmolalidade dos meios de cultura comerciais e formulados neste trabalho foi determinada através do osmômetro Osmette A modelo 5002 (Precision Systems Inc.).

4.2.13.5. Detecção da Glicoproteína do Vírus da Raiva

A detecção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) foi realizada por teste do tipo ELISA, empregando o kit *Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*, obtido no Instituto Pasteur (França). Primeiramente, a placa utilizada no ensaio foi sensibilizada com anticorpo policlonal anti-glicoproteína da raiva purificado. A glicoproteína presente na amostra liga-se então a estes anticorpos e, posteriormente, ao mesmo anticorpo contra a glicoproteína marcado com peroxidase. Com uma reação colorimétrica, determina-se a absorvância das amostras a um comprimento de onda de 492 nm. Pela comparação da absorvância medida para as amostras com a absorvância das diluições do antígeno de referência, gerando uma curva de calibração, determina-se a concentração da glicoproteína na amostra.

A dosagem de GPV nos primeiros ensaios (meios suplementados com reduzido percentual de SFB e meios SF900 II e TC100 com 10% de SFB) foi realizada segundo o procedimento acima, no qual foram empregados anticorpos policlonais. As amostras, retiradas no 5º dia de cultivo, foram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos para a separação do sobrenadante. O *pellet* formado foi então ressuspensionado em tampão PBS e novamente centrifugado nas mesmas condições. Com o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em 10% do volume original em tampão de lise (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl e 1% de Nonidet), nele mantidas por 10 minutos e então centrifugadas a 600 rpm por 2 a 3 minutos. O sobrenadante do lisado celular e o sobrenadante da cultura foram então armazenados a -20°C para posterior quantificação da glicoproteína.

No decorrer do desenvolvimento do projeto temático no qual este trabalho está inserido, notou-se que este método de preparação de amostra estaria interferindo na

dosagem de glicoproteína, com a degradação da mesma. Assim, outros métodos foram testados e optou-se por utilizar a sonicação para a lise das células. Além disso, passou-se a utilizar anticorpos monoclonais para que fosse possível detectar somente a conformação trimérica da proteína, forma que confere sua imunogenicidade. Assim, no ensaio realizado em frasco *schott* e nos ensaios RE-1 a RE-4 em reator empregando-se a formulação de meio de cultura encontrada como a mais adequada através deste estudo, o sobrenadante foi separado das células por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos, e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 10% do volume original em tampão PBS. As amostras foram então armazenadas a -20°C. Para a quantificação da glicoproteína, a amostra referente à suspensão de células foi descongelada e diluída 10 vezes em tampão PBS, voltando a sua concentração original. As amostras foram então sonicadas empregando-se o equipamento Vibra-Cell (Sonics and Materials) para a lise das células em 3 séries de 3 pulsos de 6 segundos com amplitude de 60 Hz e, no intervalo entre cada um das séries, as amostras eram mantidas por 30 segundos em gelo.

Um estudo mais detalhado dos processos de armazenamento e lise das amostras para quantificação de GPV mostrou que a melhor forma de armazenamento era o congelamento do *pellet* seco após lavagem em tampão PBS contendo sacarose (320 mM), e a melhor forma de lise era ressuspender o *pellet* ainda congelado em tampão contendo Tris (25 mM), NaCl (25 mM) e MgCl₂ (5 mM) em pH 7,4 e a 4°C, aguardar seu descongelamento e iniciar o procedimento de lise com o mesmo tampão contendo também 0,2% de Nonidet P-40, mas duas vezes concentrado. Além disso, o estudo mostrou também que uma dosagem mais eficaz é realizada com a lise de 1,0x10⁶ células. Como as amostras correspondentes aos ensaios RE-1 a RE-4 já haviam sido armazenadas em tampão PBS quando este estudo foi finalizado, alíquotas destas contendo 1,0x10⁶ células foram retiradas, e adicionou-se tampão de lise até completar o volume de 500 µL. Já no ensaio RE-5, as células foram armazenadas na forma de *pellet* seco e o protocolo otimizado foi adotado. Em ambos os casos, após serem mantidas a 4°C por 1 hora, com agitação a cada 15 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos, para a remoção dos debris celulares antes da análise.

4.2.13.6. Imunofluorescência das Células S2AcGPV2

Para a realização da imunofluorescência das células S2AcGPV2, com a finalidade de detectar a presença da glicoproteína do vírus da raiva expressa na membrana celular, foi retirada uma alíquota de 200 µL de um cultivo desta linhagem na formulação de meio de cultura escolhida como a mais adequada, realizado em garrafas T-25. O sobrenadante foi separado por centrifugação, as células lavadas 2 vezes com tampão PBS, 100 µL de solução de acetona 80% foram adicionados, e as células foram mantidas por 20 minutos em gelo. A acetona foi, então, descartada e, após evaporação, adicionou-se 50 µL do anticorpo IgGD1 (anticorpo monoclonal anti-glicoproteína da raiva contra sítio antigênico III específico do estado trimérico da glicoproteína) conjugado com fluoresceína diluído 1:300 em solução Azul de Evans 0,02%. As células foram, então, mantidas a 37°C por 1 hora e posteriormente lavadas 3 vezes com tampão PBS. Adicionou-se 50 µL de uma solução de glicerol 50%, e as células foram analisadas em microscópio de fluorescência. O mesmo procedimento foi realizado para a linhagem S2 selvagem.

4.2.13.7. Determinação da Velocidade Específica Máxima de Crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento foi estimada através da determinação do coeficiente angular da reta do logaritmo neperiano da concentração de células viáveis *versus* tempo durante a fase de crescimento exponencial.

4.2.13.8. Determinação da Produtividade Celular Máxima

A produtividade celular máxima foi calculada de acordo com Wang e colaboradores (1979) para caracterizar a produção celular durante todo o cultivo, sendo determinada traçando-se uma reta que passa pela origem e é tangente à curva de concentração celular contra o tempo de cultivo no ponto de maior inclinação e determinando-se seu coeficiente angular.

4.2.13.9. Determinação dos Consumos Específicos de Glicose e Glutamina

Os consumos específicos de glicose e glutamina foram determinados durante a fase exponencial de crescimento e calculados de acordo com a Equação 4.1:

$$q = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (4.1)$$

onde S é a concentração de substrato, X é a concentração de células viáveis, t é tempo. Os valores de dS/dt foram calculados utilizando-se o programa computacional Microcal Origin 6.0.

4.2.13.10. Determinação do Coeficiente de Rendimento de Células a partir de Glicose ($Y_{X/glc}$)

O coeficiente de rendimento de células a partir de glicose, que corresponde à quantidade de lactato produzido por uma unidade de glicose consumida, foi calculado de acordo com a Equação 4.2:

$$Y_{X/glc} = \frac{X_t - X_0}{Glc_t - Glc_0} * 10^6 \quad (4.2)$$

onde, Glc_t é a concentração de glicose no instante t, Glc_0 é a concentração de glicose no instante inicial, X_t é a concentração de células viáveis no instante t e Lac_0 é a concentração de células viáveis no instante inicial.

4.2.13.11. Determinação do Coeficiente de Rendimento de Lactato a partir de Glicose ($Y_{lac/glc}$)

O coeficiente de rendimento de lactato a partir de glicose, que corresponde à quantidade de lactato produzido por uma unidade de glicose consumida, foi calculado de acordo com a Equação 4.3:

$$Y_{lac/glc} = \frac{Lac_t - Lac_0}{Glc_t - Glc_0} \quad (4.3)$$

onde, Glc_t é a concentração de glicose no instante t, Glc_0 é a concentração de glicose no instante inicial, Lac_t é a concentração de lactato no instante t e Lac_0 é a concentração de lactato no instante inicial.

4.2.13.12. Cálculo do Teor de GPV

O teor de GPV, expresso em nanogramas de glicoproteína por 10^7 células, foi calculado de acordo com a Equação 4.4:

$$\text{Teor de GPV} = \frac{GPV_t}{X_{Tt}} \cdot 10^7 \quad (4.4)$$

onde GPV_t é a concentração de glicoproteína no tempo t e X_{Tt} é a concentração total de células no tempo t.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo das Linhagens S2 Selvagem e S2AcGPV2 em Meio SF900 II (Ensaio CIN-1)

Para observar o comportamento das células S2 e S2AcGPV2 em um meio rico e livre de soro como o SF900 II, foi realizada uma cinética de crescimento (ensaio CIN-1), empregando-se concentrações de inóculo de 5 e 10×10^5 células viáveis/mL em fase exponencial. Os ensaios foram realizados em duplicata, e a concentração e a viabilidade celular, o consumo de glicose e glutamina e a produção de lactato foram monitorados. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3.

Na Figura 5.1A, verificam-se as cinéticas de crescimento obtidas para a linhagem S2 empregando-se diferentes concentrações de inóculo. Em ambas as culturas, as células apresentaram uma rápida adaptação, e a duração da fase lag foi bem inferior a 24 horas. A concentração máxima de células obtida para a cultura com inóculo de 5×10^5 células/mL foi de cerca de $2,08 \times 10^7$ células viáveis/mL, concentração maior que a obtida para a cultura com inóculo de 10×10^5 células/mL ($1,71 \times 10^7$ células viáveis/mL), as velocidades específicas de crescimento foram de 0,043 e 0,037 h^{-1} , e o término do crescimento exponencial ocorreu no 4^o e no 3^o dias, respectivamente. Em ambos os cultivos, as células permaneceram por um longo período na fase estacionária, o que as distingue de células de mamíferos, que apresentam fase estacionária curta. Esta extensão da fase estacionária coincide com a presença de glicose no meio de cultura, e também foi observada para as células de inseto Sf9 e High Five por Ikonomou e colaboradores (2001), que atribuíram este prolongamento à alta concentração de glicose em combinação com Primatone RL presentes no meio de cultura empregado. A viabilidade celular manteve-se acima de 90% até o 14^o dia de cultivo.

Para a linhagem S2AcGPV2 (Figura 5.1B), pode-se observar que a cultura com menor concentração de inóculo apresentou uma fase lag de cerca de 2 dias, período maior que o verificado para o cultivo iniciado com 10×10^5 células/mL (menor que 24 horas). Esta maior dificuldade de adaptação apresentada pela cultura iniciada com uma menor concentração de inóculo deve-se provavelmente ao fato da necessidade das células

condicionarem o ambiente através da liberação de substâncias no meio, o que ocorre mais rapidamente com uma maior concentração de células.

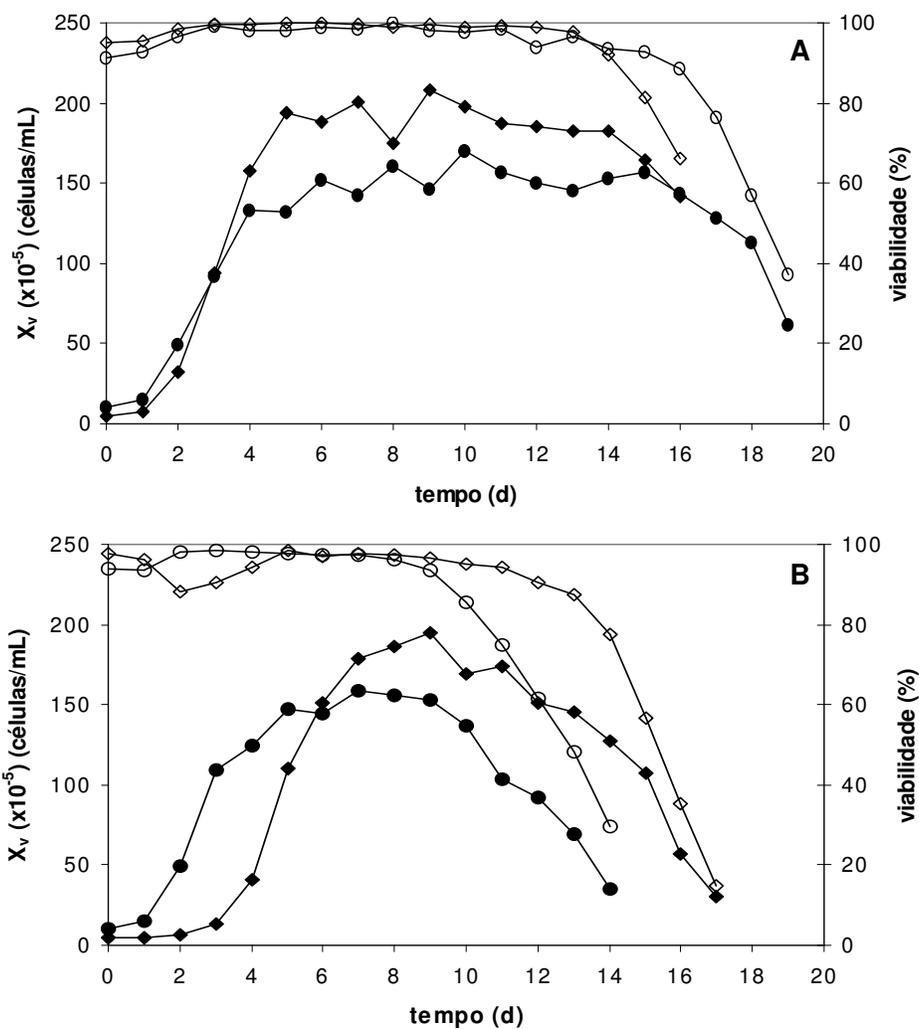


Figura 5.1. Concentração de células viáveis (símbolos fechados) e viabilidade celular (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio SF900 II (ensaio CIN-1). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (\blacklozenge) e 10×10^5 células viáveis/mL (\bullet).

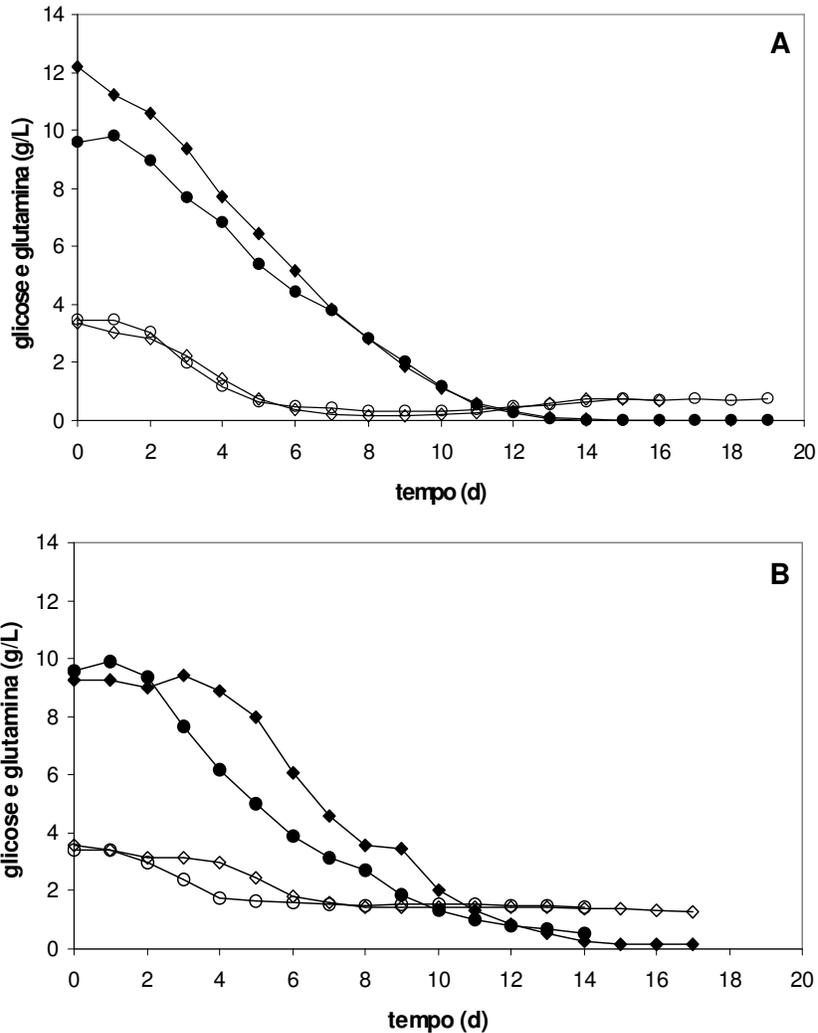


Figura 5.2. Concentrações de glicose (símbolos fechados) e glutamina (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio SF900 II (ensaio CIN-1). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (●).

Após a fase de adaptação, a cultura com concentração de inóculo de 5×10^5 células/mL cresceu a uma velocidade específica de cerca de $0,040 \text{ h}^{-1}$, atingindo uma concentração máxima de $1,95 \times 10^7$ células viáveis/mL. Como verificado também para a linhagem selvagem, a máxima concentração atingida pela cultura com maior concentração de inóculo foi menor (cerca de $1,59 \times 10^7$ células viáveis/mL) que aquela observada para a

cultura com concentração de inóculo de 5×10^5 células/mL. Entretanto, a velocidade específica de crescimento foi bastante similar ($0,041 \text{ h}^{-1}$). As culturas com 5 e 10×10^5 células/mL saíram da fase exponencial no 5º e 3º dias, respectivamente. Após atingirem a concentração celular máxima, iniciou-se a fase de declínio em ambos os cultivos, na qual o número de células viáveis passou a decrescer com o tempo. Em relação à viabilidade, as culturas com concentrações de inóculo de 5 e 10×10^5 células/mL mantiveram-se com viabilidade acima de 90% até 12º e o 9º dias de cultivo, respectivamente.

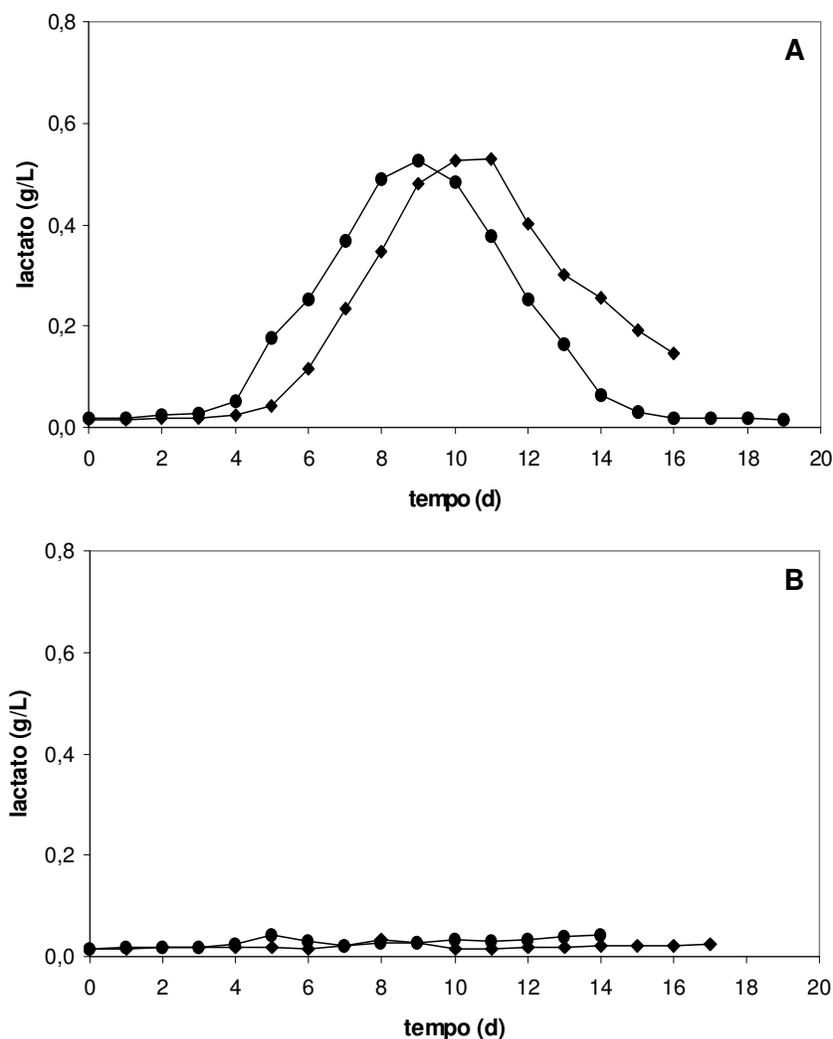


Figura 5.3. Concentrações de lactato obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio SF900 II (ensaio CIN-1). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (●).

Comparando-se as duas linhagens, verifica-se que em ambos os casos, as culturas iniciadas com as menores concentrações de inóculo foram aquelas que atingiram as maiores concentrações de células viáveis e, para as mesmas concentrações de inóculo, as densidades máximas obtidas foram bastante similares para as duas linhagens, com apenas uma discreta vantagem para a linhagem selvagem. Em relação à velocidade específica de crescimento, os valores obtidos também foram bastante próximos. Um outro aspecto observado foi o fato das células selvagens permanecerem por um longo período na fase estacionária. A viabilidade de todos os cultivos também se manteve alta durante todo o período.

Através do monitoramento das concentrações de glicose e glutamina, observa-se que, para a linhagem S2, a glicose foi totalmente consumida em 13 dias de cultivo, e a glutamina atingiu níveis bastante reduzidos no 7^o dia de cultivo (Figura 5.2A). Com o início da queda de viabilidade, a concentração de glutamina no meio de cultura voltou a subir, o que pode estar relacionado à liberação deste nutriente do interior das células em função da morte celular. Os consumos específicos de glicose foram de $1,01 \times 10^{-11}$ g/célula*h e $1,04 \times 10^{-11}$ g/célula*h, e de glutamina de $4,51 \times 10^{-12}$ g/célula*h e $7,03 \times 10^{-12}$ g/célula*h, valores calculados na fase exponencial de crescimento para as culturas com inóculos de 5×10^5 e 10×10^5 células/mL, respectivamente.

Como a cultura de células S2AcGPV2 com inóculo de 5×10^5 células/mL apresentou uma fase lag mais prolongada, observou-se a manutenção do nível de glicose no início do cultivo, que passou a ser consumida a partir do 3^o dia (Figura 5.2B). O mesmo ocorreu com a cultura com maior concentração de inóculo, mas o início do consumo de glicose ocorreu mais cedo, no primeiro dia de cultivo. A glutamina foi consumida mais rapidamente pela cultura com inóculo de 10×10^5 células/mL, a uma taxa de $4,50 \times 10^{-12}$ g/célula*h, enquanto para a cultura com menor concentração de inóculo, a taxa de consumo foi de $2,71 \times 10^{-12}$ g/célula*h. O mesmo foi observado em relação ao consumo de glicose, com o aumento da concentração inoculada, houve um aumento do consumo de $3,89 \times 10^{-12}$ g/célula*h para $9,52 \times 10^{-12}$ g/célula*h.

De uma maneira geral, as taxas específicas de consumo de glicose e glutamina apresentadas pela linhagem S2 foram superiores às encontradas para a linhagem S2AcGPV2, com exceção do cultivo desta linhagem com inóculo de 10×10^5 células/mL, em que o consumo de glutamina foi bastante acelerado, sendo superior ao das outras

culturas. Nota-se também que nenhum destes nutrientes avaliados, glicose e glutamina, foi o responsável pela saída das culturas da fase exponencial de crescimento, já que no momento em que isto ocorreu suas concentrações não eram limitantes.

Na Figura 5.3, observa-se claramente que a linhagem S2 produziu lactato e que o mesmo não ocorreu com a linhagem transfetada. A produção de lactato iniciou-se quando os níveis de glicose estavam em entre 6 e 7 g/L e atingiu uma concentração de cerca de 0,5 g/L. Com o esgotamento de glicose no meio de cultura, este metabólito passou a ser consumido pelas células. Para a linhagem S2, a queda na viabilidade coincide com a diminuição da concentração de lactato no meio de cultura, indicando uma limitação por fonte de carbono nesta etapa. Ikonomou e colaboradores (2001) relatam que o acúmulo de lactato pode estar relacionado ao estresse causado pela combinação dos efeitos de dois ou mais hidrolisados, no caso das células Sf9 e High Five. O meio SF900 II possui formulação não disponibilizada na literatura, mas há relatos que ele contém extrato de levedura (Doverskog *et al.*, 2000), e talvez a presença de um outro hidrolisado neste meio possa ter causado o acúmulo deste metabólito. Entretanto, como mencionado anteriormente, não houve acúmulo de lactato no cultivo das células S2AcGPV2. Esta e outras diferenças metabólicas observadas entre as linhagens selvagem e transfetada devem estar relacionadas à modificação genética efetuada na célula S2. Além das células S2AcGPV2 terem provavelmente seu metabolismo mais voltado à expressão da glicoproteína, esta é uma proteína de membrana, expressa em uma forma trimérica e com alta massa molar, o que pode interferir nos processos de difusão de nutrientes e metabólitos.

Os resultados obtidos mostram que a glicose pode ser um dos fatores limitantes do crescimento celular em cultivos que empregam meio basais, já que toda a glicose foi consumida nestes ensaios, e meios mais pobres possuem uma concentração muito menor deste composto. Uma diferença significativa observada entre as duas linhagens é o fato das células selvagens produzirem lactato e o consumirem posteriormente, o que não ocorreu com a linhagem transfetada.

Conforme já mencionado na Revisão de Literatura, são escassos os trabalhos que apresentam dados sobre o cultivo e o metabolismo de células de *Drosophila melanogaster*. A maioria dos trabalhos publicados enfoca apenas a obtenção de produtos recombinantes através do cultivo destas células, o que dificulta a comparação dos dados obtidos neste

trabalho com resultados obtidos por outros autores. Por outro lado, esta escassez de dados ressalta a importância da realização de estudos como os desenvolvidos neste trabalho.

5.2. Adaptação da Linhagem S2 Selvagem em Meio TNM-FH (Ensaio AD-1)

Para encontrar uma composição de meio de cultura adequada para o crescimento das linhagens S2 selvagem e S2AcGPV2, com o intuito de obter uma formulação mais barata em que as células transfectadas pudessem expressar de maneira conveniente a glicoproteína do vírus da raiva, foi necessário adaptar estas células a um meio de cultura basal, mais pobre, já que elas estavam originalmente adaptadas ao meio SF900 II, um meio livre de proteínas que suporta um elevado crescimento celular de várias linhagens celulares de inseto. Segundo Hewlett (1991), existem duas estratégias básicas para a adaptação de uma célula a meios livres de soro, a redução gradual da concentração de soro fetal bovino, o que levaria às células a uma lenta adaptação, e a transferência direta das células para um meio livre de soro. Os mesmos procedimentos foram adotados para o processo inverso, a transferência das células de um meio livre de soro para meios basais suplementados com este composto.

As primeiras tentativas de adaptação foram realizadas com a célula selvagem, e o meio de cultura escolhido foi o meio basal TNM-FH, meio que tem como base o meio Grace suplementado com 3,33 g/L de extrato de levedura e 3,33 g/L de lactalbumina hidrolisada (ensaio AD-1). Tentativas de transferir as células S2 selvagens diretamente do meio SF900 II para o meio TNM-FH com 10% de soro fetal bovino foram realizadas empregando-se diferentes concentrações de inóculo, de 0,5 a 2×10^6 células viáveis/mL. Em todos os cultivos, a morte celular ocorreu em até 24 horas.

Uma outra alternativa adotada foi tentar cultivar estas células primeiramente em meio TNM-FH contendo 10% de soro fetal bovino com diferentes percentuais de SF900 II (10, 15 e 20%) e depois reduzir o percentual do meio rico gradativamente. O inóculo foi obtido de uma cultura em SF900 II em fase exponencial de crescimento e a concentração escolhida para este ensaio foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL.

Como pode ser observado na Figura 5.4, a viabilidade celular caiu continuamente após a inoculação, sendo que no segundo dia de cultivo todas as células estavam mortas, independentemente do percentual de SF900 II adicionado.

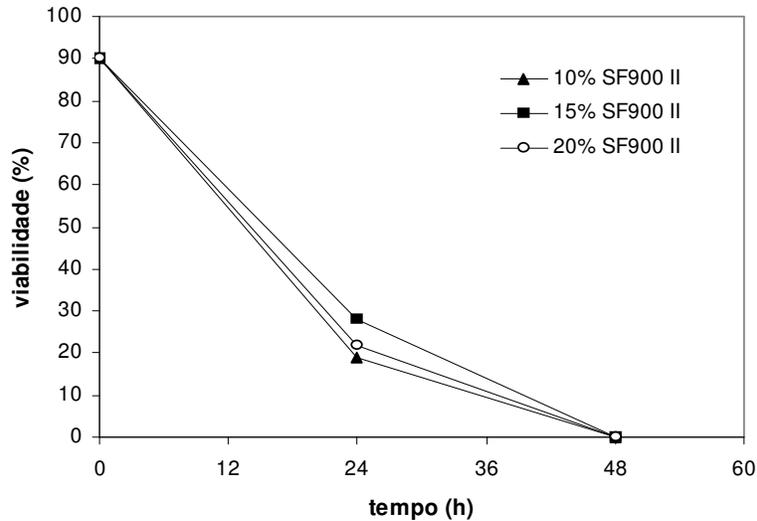


Figura 5.4. Viabilidade da linhagem S2 em cultivos em meio TNM-FH contendo 10% de SFB e diferentes percentuais de SF900 II (ensaio AD-1).

Após as tentativas de cultivo da linhagem S2 selvagem em meio TNM-FH contendo 10% de SFB com 10, 15 e 20% de meio SF900 II, um cultivo foi realizado com um meio composto por 50% de meio SF900 II e 50% de meio TNM-FH contendo 10% soro fetal bovino, cujos resultados estão indicados na Figura 5.5. A concentração de inóculo foi de $2,0 \times 10^6$ células viáveis/mL, obtido de uma cultura em SF900 II em fase exponencial.

Observando-se a Figura 5.5, verifica-se que a viabilidade da cultura caiu para 76% no segundo dia e variou entre 58 e 76% durante toda a sua manutenção. Apesar da viabilidade ter se mantido em níveis aceitáveis para a continuação do trabalho, um meio de cultura contendo 50% do meio SF900 II não era adequado para a futura otimização da formulação.

Como isso, foi feita uma tentativa de diminuir gradativamente o percentual de SF900 II no meio de cultura. O inóculo de $2,0 \times 10^6$ células viáveis/mL foi obtido como anteriormente descrito. Como se verifica na Figura 5.6, ao transferir as células do meio SF900 II para o meio com 50% de meio TNM-FH com 10% de soro fetal bovino, a viabilidade da cultura passou de 90 para 71%, e ao passar deste meio para um meio com 65% de meio TNM-FH com 10% de soro fetal bovino, a viabilidade celular caiu de cerca de 76% para 44% (3º dia), voltando a subir para 65% após 24 horas. Porém, após uma

segunda passagem das células neste meio, a viabilidade caiu, mantendo-se na faixa de 16 a 27% durante o período restante do ensaio.

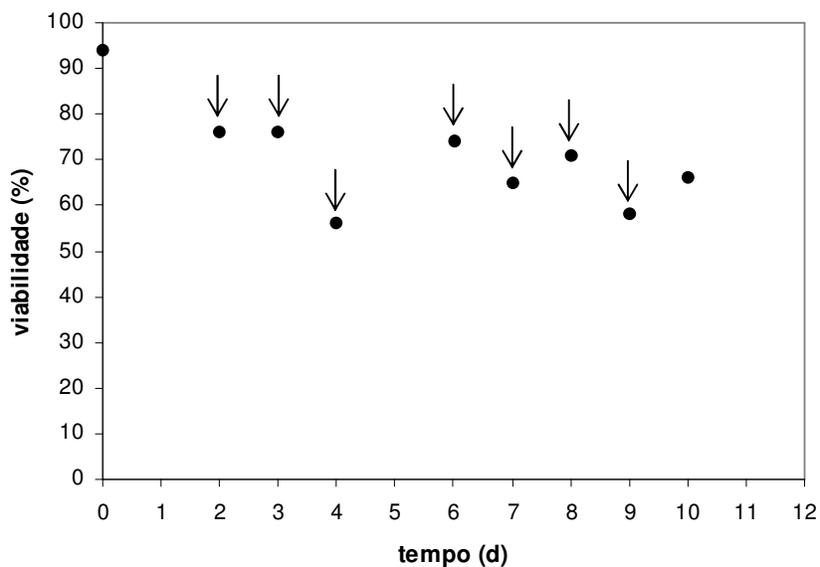


Figura 5.5. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em uma cultura com 50% de meio SF900 II e 50% de meio TNM-FH com 10% de soro fetal bovino (ensaio AD-1). As setas indicam os repiques realizados.

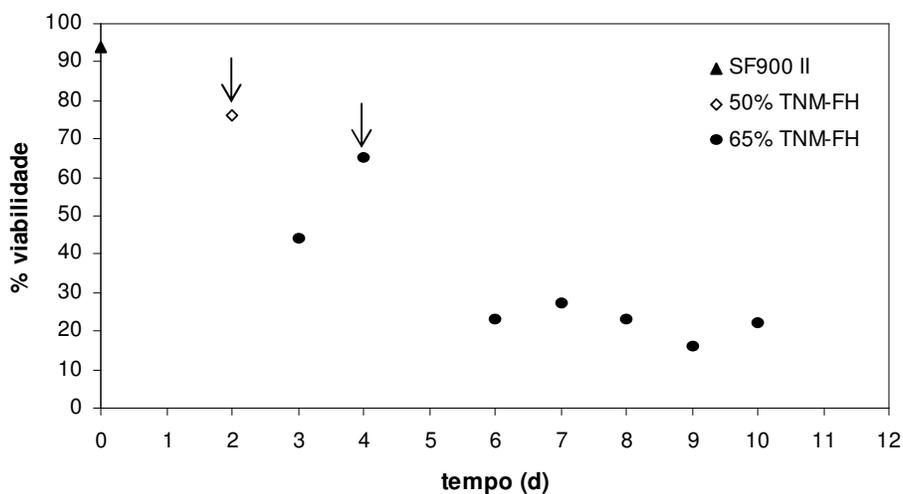


Figura 5.6. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em um cultivo com redução do percentual de SF900 II no meio de cultura composto pelo meio TNM-FH com 10% de soro fetal bovino e meio SF900 II (ensaio AD-1). As setas indicam os repiques realizados.

Como não foi possível cultivar a linhagem S2 selvagem no meio TNM-FH contendo 10% de soro fetal bovino na ausência ou mesmo com um pequeno percentual de SF900 II, não foram realizadas tentativas de cultivo da linhagem S2AcGPV2 e verificou-se a possibilidade de substituir o meio TNM-FH pelo meio TC100.

5.3. Adaptação da Linhagem S2 Selvagem em Meio TC100 (Ensaio AD-2)

Na primeira tentativa de adaptação das células S2 ao meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio AD-2), realizou-se um ensaio no qual o percentual deste meio foi aumentado gradativamente em uma cultura cultivada originalmente em SF900 II. A concentração do inóculo foi de $2,0 \times 10^6$ células viáveis/mL. Observa-se na Figura 5.7 que, ao transferir a cultura do meio SF900 II para o meio composto por 50% de SF900 II e 50% de TC100 contendo 10% de soro fetal bovino, a viabilidade caiu para 70%, caindo ainda mais (para cerca de 57%) quando o percentual de TC100 com 10% de soro fetal bovino subiu para 65%, o que aconteceu no segundo dia de cultivo. Do segundo ao quarto dia, houve uma recuperação da viabilidade celular, que atingiu o valor de 75%. As células foram então passadas para um meio com 80% de TC100 contendo 10% de soro fetal bovino e apenas 20% de SF900 II. A viabilidade da cultura caiu bastante, atingindo o valor de 9%, mas a cultura foi se recuperando gradativamente até atingir cerca de 80% de células viáveis.

Com os bons resultados obtidos com a redução gradativa do meio SF900 II, foi feita também a tentativa de eliminar completamente o meio SF900 II. As células S2 foram passadas de um meio contendo 50% de SF900 II e 50% de TC100 com 10% de soro fetal bovino diretamente para o meio TC100 com 10% de soro fetal bovino. A concentração de inóculo foi de $2,0 \times 10^6$ células viáveis/mL. Com a troca de meio, a viabilidade celular caiu para 17%, como pode ser visto na Figura 5.8. Gradativamente, a cultura foi se recuperando e a viabilidade atingiu o valor de 93% no 21^o dia de cultivo. Após este período, a viabilidade começou a cair, chegando a 44% no 32^o dia. A viabilidade, então, subiu novamente, 73% no 36^o dia, mas, com um novo repique, voltou a cair.

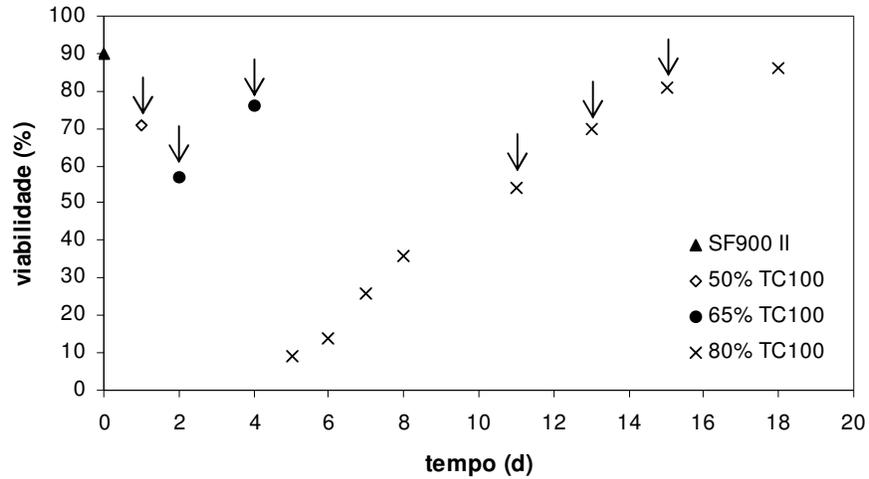


Figura 5.7. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em um cultivo com redução do percentual de SF900 II no meio de cultura composto por meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino e meio SF900 II (ensaio AD-2). As setas indicam os repiques realizados.

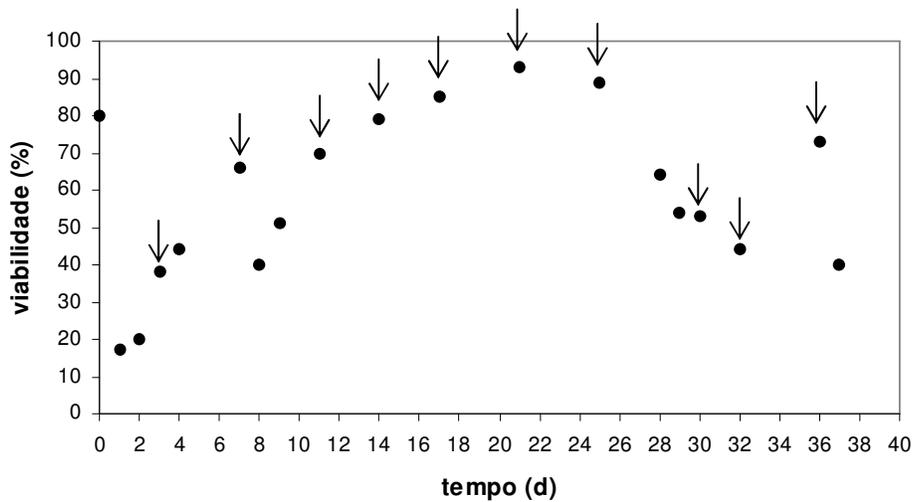


Figura 5.8. Viabilidade da linhagem S2 selvagem em um cultivo em meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino (ensaio AD-2). As setas indicam os repiques realizados.

Com esta queda da viabilidade, passou-se a trabalhar apenas com as células que aderiam ao frasco de cultivo. Eram realizadas apenas trocas de meio com a remoção das

células mortas; repiques com a ressuspensão das células não eram efetuados. Com isso, foi possível aumentar a viabilidade da cultura, com a seleção de uma população capaz de se replicar no meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

5.4. Adaptação da Linhagem S2AcGPV2 em Meio TC100 (Ensaio AD-3)

Como realizado com a linhagem S2 selvagem, um ensaio com redução do percentual de SF900 II do meio de cultura composto por meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino e meio SF900 II também foi realizado para a linhagem transfectada (ensaio AD-3). A concentração de inóculo foi de $1,5 \times 10^6$ células viáveis/mL, obtido de uma cultura em SF900 II em fase exponencial.

Observa-se na Figura 5.9 que a viabilidade celular caiu de 90 para 55% quando houve a passagem das células do meio SF900 II para o meio composto por 50% de meio TC100 com 10% de soro fetal bovino e 50% de meio SF900 II. Houve uma recuperação da cultura e a viabilidade atingiu cerca de 70% no terceiro dia. As células foram então passadas para um meio contendo 75% de TC100 com 10% de SFB. A viabilidade celular caiu para 25% com posterior recuperação. No décimo dia, quando a viabilidade era de 50%, as células foram passadas para um meio com 80% de meio TC100 com 80% de SFB. Nesta etapa, a viabilidade variou de 46 a 58%.

As células S2AcGPV2 também foram passadas de um meio contendo 50% de meio SF900 II e 50% de meio TC100 com 10% de soro fetal bovino diretamente para o meio TC100 com 10% de soro fetal bovino. A concentração de inóculo foi de $2,0 \times 10^6$ células viáveis/mL. Observando-se a Figura 5.10, verifica-se que, como ocorreu com a linhagem selvagem, a viabilidade caiu de 83 para 19% com a troca de meio. Houve, então, uma recuperação e a viabilidade atingiu cerca de 70%. Após o 16^o dia, a viabilidade voltou a cair, variando entre 40 e 50%.

O mesmo procedimento realizado com a linhagem S2 selvagem foi realizado com a linhagem S2 transfectada. Com a realização de trocas de meio, foi possível aumentar a viabilidade da cultura e selecionar as células capazes de crescer no meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

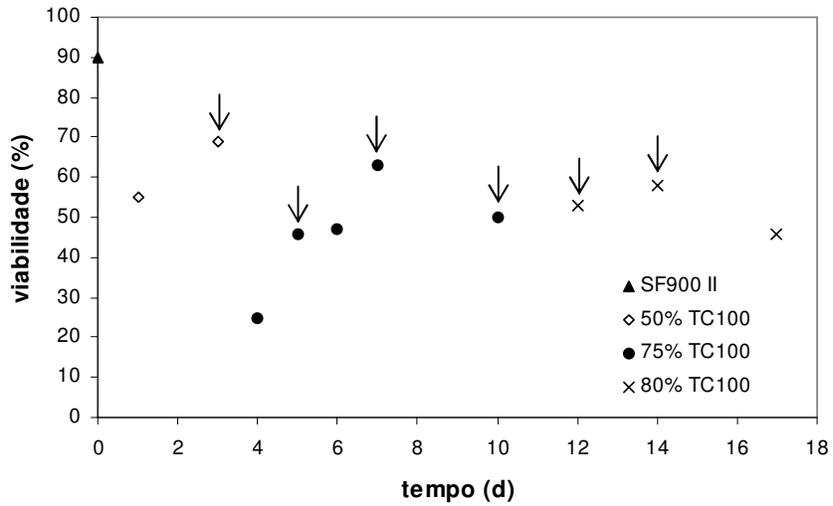


Figura 5.9. Viabilidade da linhagem S2AcGPV2 em um cultivo com redução do percentual de SF900 II no meio de cultura composto por meio TC100 com 10% de soro fetal bovino e meio SF900 II (ensaio AD-3). As setas indicam os repiques realizados.

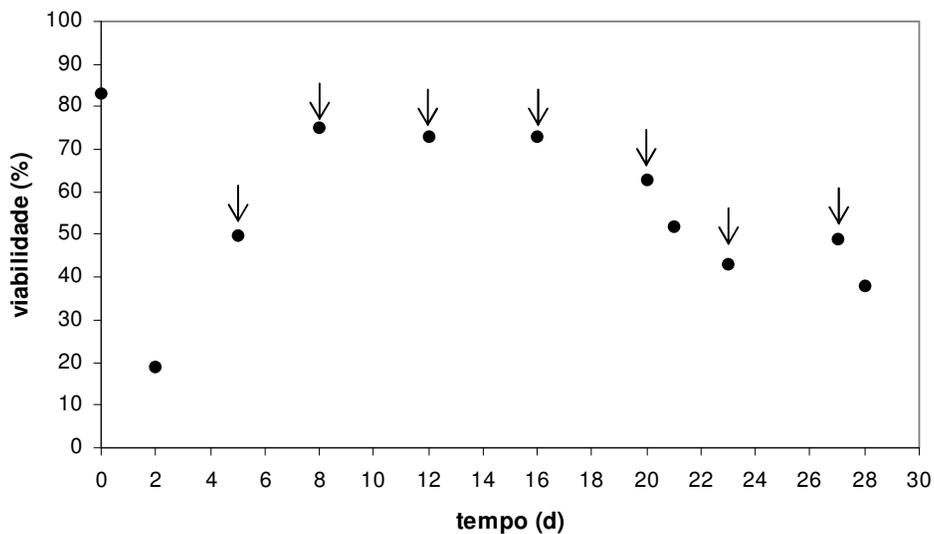


Figura 5.10. Viabilidade da linhagem S2AcGPV2 em um cultivo em meio TC100 com 10% de soro fetal bovino (ensaio AD-3). As setas indicam os repiques realizados.

5.5. Cultivo das Linhagens S2 Selvagem e S2AcGPV2 em Meio TC100 Suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-2)

Após a adaptação das células transfectadas ao meio TC100, realizou-se uma cinética de crescimento para estudar mais detalhadamente o comportamento destas células neste meio basal suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio CIN-2), já que não existem dados na literatura sobre o cultivo destas células especificamente neste meio. As culturas foram realizadas com duas diferentes concentrações de inóculo, de 5×10^5 e 10×10^5 células viáveis/mL, e os resultados são apresentados nas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13.

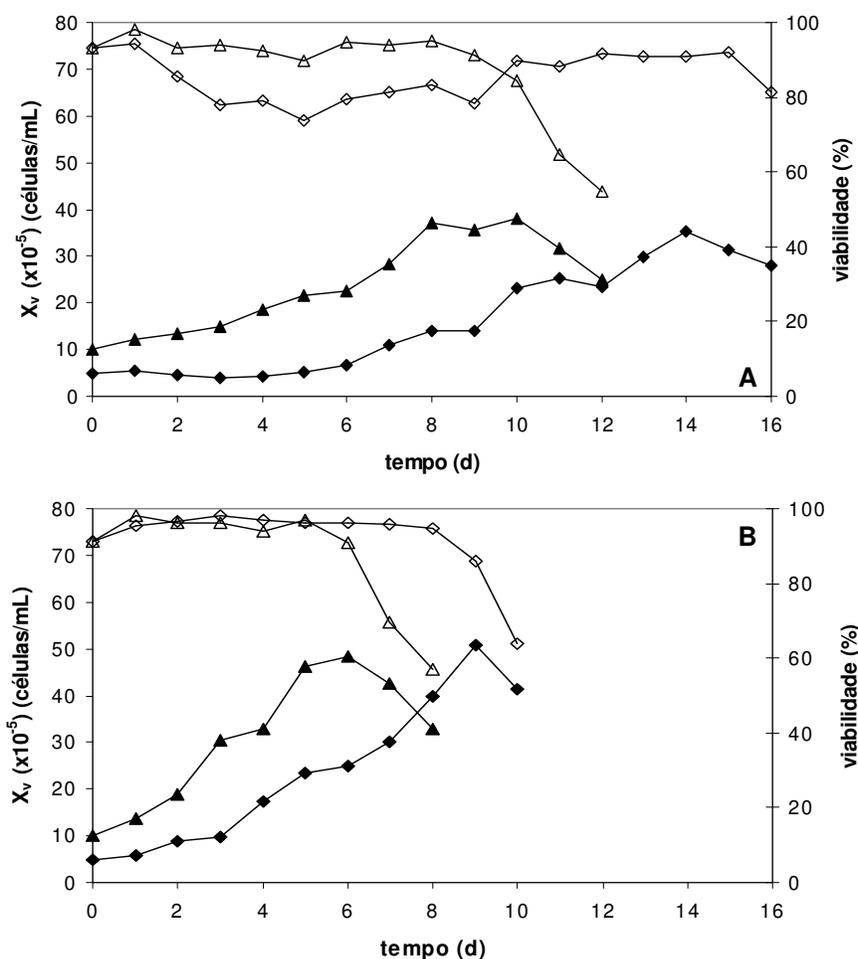


Figura 5.11. Concentração de células viáveis (símbolos fechados) e viabilidade celular (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio CIN-2). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (▲).

Na Figura 5.11A, observam-se os resultados obtidos para a linhagem S2 selvagem com as diferentes concentrações de inóculo. A cultura com concentração de inóculo de 5×10^5 células/mL apresentou uma fase de adaptação bastante ampla (cerca de 4 dias), o que não ocorreu com a cultura com maior concentração de inóculo, apesar desta ter apresentado uma velocidade específica de crescimento bastante baixa ($0,006 \text{ h}^{-1}$). A velocidade específica de crescimento apresentada pela cultura com inóculo de 5×10^5 células/mL foi de $0,015 \text{ h}^{-1}$. As concentrações máximas de células obtidas foram bastante similares nas duas culturas, sendo de $3,5 \times 10^6$ células/mL para a menor concentração de inóculo e $3,7 \times 10^6$ células/mL para o maior inóculo. A cultura iniciada com 5×10^5 células/mL não apresentou fase estacionária; a concentração de células viáveis passou a diminuir assim que a concentração máxima foi atingida. Já o cultivo iniciado com 10×10^5 células/mL permaneceu por cerca de 2 dias nesta fase. Em relação à viabilidade celular, a cultura com menor inóculo apresentou uma queda na viabilidade no início do cultivo, atingindo 74% no 5º dia, e voltando a se recuperar após este período. Para a maior concentração de inóculo, a viabilidade manteve-se acima de 90% até o 9º dia de cultivo.

Já para a linhagem transfectada (Figura 5.11B), observou-se uma fase lag de cerca de 1 dia quando uma menor concentração de inóculo foi empregada, o que não aconteceu para a maior concentração. As concentrações máximas atingidas foram de $5,1 \times 10^6$ células/mL (inóculo de $5,0 \times 10^5$ células/mL) e $4,8 \times 10^6$ células/mL (inóculo de 10×10^5 células/mL). Os cultivos não apresentaram fase estacionária e as velocidades específicas de crescimento foram de $0,015 \text{ h}^{-1}$. A viabilidade celular manteve-se acima de 90% durante quase todo o cultivo para as diferentes concentrações de inóculo.

De maneira geral, verifica-se que as concentrações máximas de células atingidas por cada linhagem foram bastante similares, independentemente da concentração de inóculo. Entretanto, os valores obtidos com a linhagem transfectada foram superiores aos obtidos com a linhagem selvagem. Com exceção do cultivo realizado com a linhagem S2 a uma concentração inicial de 5×10^5 células/mL, que apresentou uma baixa velocidade de crescimento, o restante das culturas apresentou velocidades específicas de crescimento muito similares, de cerca de $0,015 \text{ h}^{-1}$.

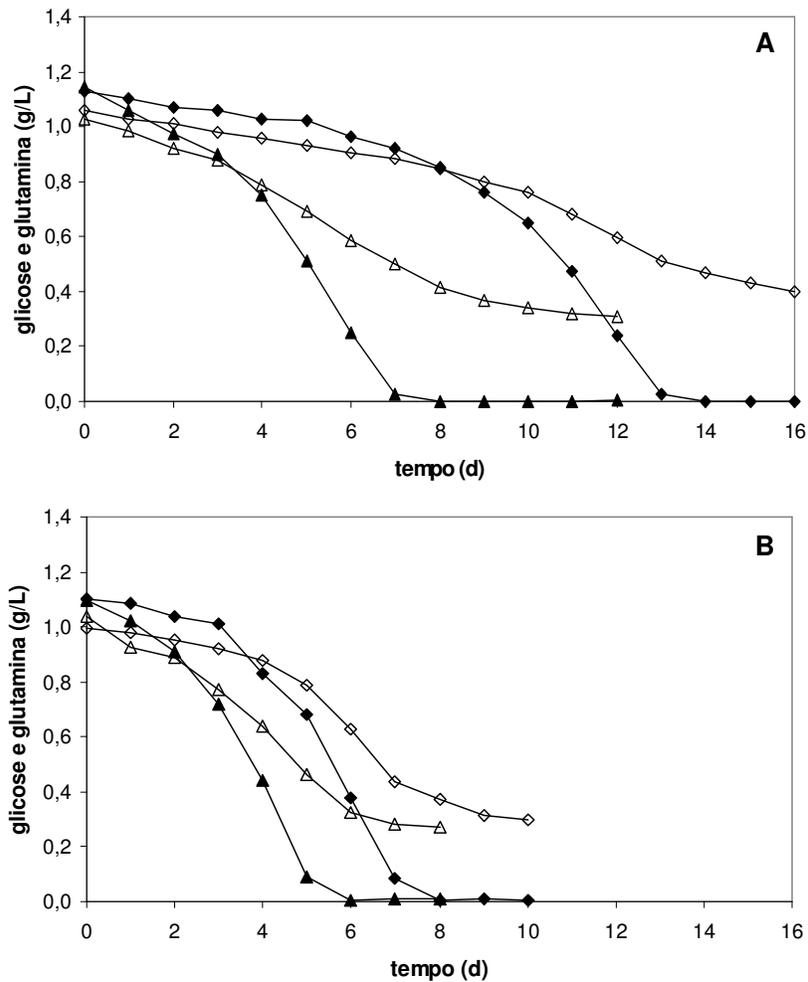


Figura 5.12. Concentrações de glicose (símbolos fechados) e glutamina (símbolos abertos) obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio CIN-2). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (▲).

Na Figura 5.12A, podem-se observar os consumos de glicose e glutamina nos diferentes cultivos da linhagem S2 selvagem. Verifica-se que, em ambos os casos, o crescimento celular foi interrompido logo após o esgotamento da glicose, que ocorreu no 7º dia de cultivo para a maior concentração de inóculo e no 13º dia para a menor. Como a cultura com concentração inicial de 5×10^5 células/mL apresentou uma extensa fase de adaptação, o consumo inicial de glicose foi bastante lento, intensificando-se após este

período. A glutamina não se esgotou durante os cultivos, e seu consumo também apresentou uma taxa menor na cultura com menor concentração de inóculo. Na fase de crescimento exponencial, as taxas específicas de consumo de glicose foram de $2,79 \times 10^{-12}$ g/célula*h e $2,68 \times 10^{-12}$ g/célula*h, e de glutamina de $1,37 \times 10^{-12}$ g/célula*h e $1,44 \times 10^{-12}$ g/célula*h, respectivamente para a menor e a maior concentração inicial de células, ou seja, muito similares dentro das mesmas categorias.

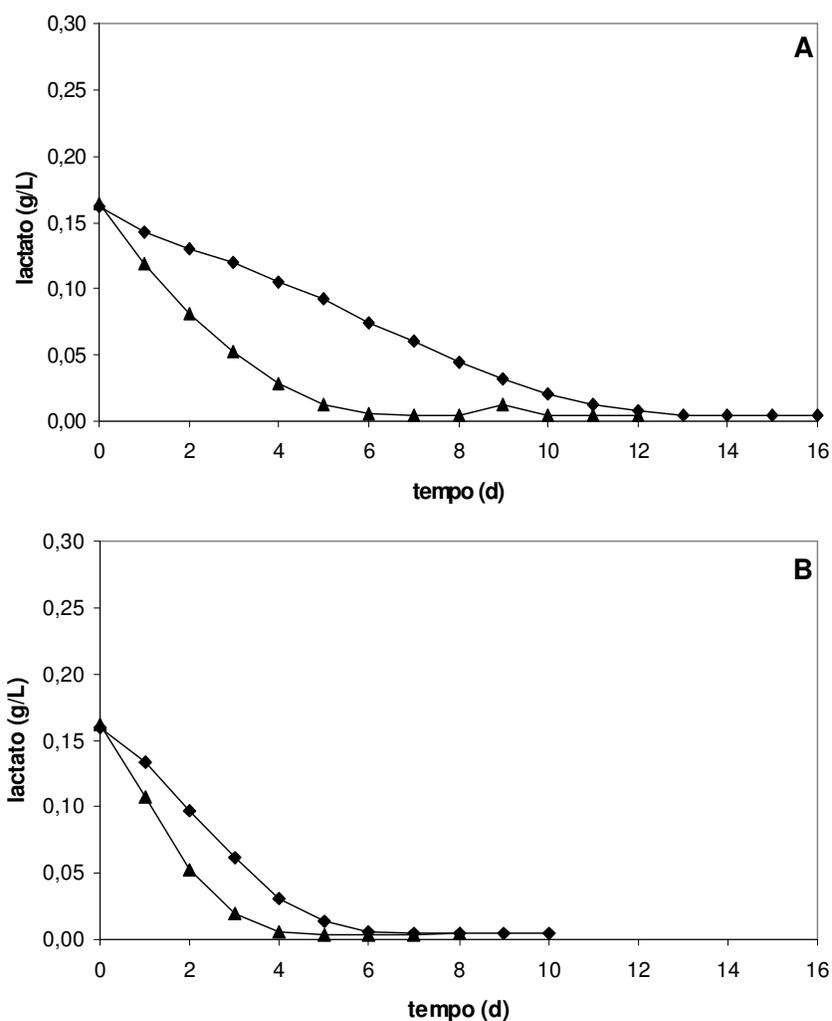


Figura 5.13. Concentrações de lactato obtidas para as cinéticas de crescimento das linhagens S2 (A) e S2AcGPV2 (B) em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ensaio CIN-2). Concentrações de inóculo de $5,0 \times 10^5$ (◆) e 10×10^5 células viáveis/mL (▲).

Para a linhagem S2AcGPV2 (Figura 5.12B), a interrupção do crescimento celular também foi notada após a escassez de glicose no meio de cultura, como ocorreu para a linhagem selvagem, que aconteceu no 8º e no 6º dia para o menor e o maior inóculo, respectivamente. As taxas de consumo de glicose na fase de crescimento exponencial foram bastante similares, sendo de $3,33 \times 10^{-12}$ e $2,80 \times 10^{-12}$ g/célula*h, e as de glutamina foram de $5,30 \times 10^{-12}$ e $8,66 \times 10^{-12}$ g/célula*h, respectivamente para os inóculos de 5 e 10×10^5 células/mL. Não houve esgotamento de glutamina, e a concentração final foi de cerca de 0,3 g/L em ambos os cultivos. Comparando-se as duas linhagens, observa-se que as taxas de consumo de glicose na fase exponencial foram similares. Já o consumo de glutamina foi maior no caso da linhagem S2AcGPV2. Como mencionado anteriormente, as diferenças observadas entre as duas linhagens podem ser atribuídas ao fato das células transfectadas terem seu metabolismo voltado também para a expressão da glicoproteína e desta ficar ancorada à superfície celular.

Na Figura 5.13, observa-se que ambas as linhagens consumiram o lactato residual presente no meio de cultura e que não houve produção deste metabólito durante o cultivo.

Com estes resultados, observou-se que o meio TC100 é capaz de suportar o crescimento adequado das células S2AcGPV2 e que, no caso deste meio de cultura, a glicose é o nutriente limitante do crescimento celular. Com a ausência de glicose, o crescimento celular cessou, mostrando que a adição deste composto ao meio TC100 é de grande importância para um maior crescimento celular, como relatado por Sondergaard (1996) para células S2 transfectadas para a produção do fator IX de coagulação sanguínea humano.

O meio TC100 foi, então, escolhido para ser utilizado como meio basal nos estudos de formulação de meio de cultura. Diferentes suplementos, como concentrado protéico de soro de leite, *yeastolate*, Hy Soy, emulsão lipídica, lactoalbumina hidrolisada, glicose, glutamina e Pluronic F68, foram adicionados a este meio, e o desempenho das células S2AcGPV2 foi avaliado quanto ao crescimento e a viabilidade celular.

5.6. Avaliação dos Efeitos da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, Yeastolate, Lactoalbumina Hidrolisada e Soro Fetal Bovino no Crescimento e na Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} (Ensaio PF-1)

Com o sucesso de alguns grupos de pesquisa na utilização de leite, colostro ou extrato de soro (Ramírez *et al.*, 1990; Batista *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 2005) e de extrato de levedura (Drews *et al.*, 1995; Wu e Lee, 1998; Wu *et al.*, 1998; Ikonomou *et al.*, 2001) no cultivo de células animais, propôs-se um estudo da utilização destes compostos, juntamente com a lactoalbumina hidrolisada, na tentativa de reduzir o percentual de soro fetal bovino do meio de cultura.

Primeiramente, foram avaliados os efeitos das variáveis concentrado protéico de soro de leite, *yeastolate*, lactoalbumina hidrolisada e soro fetal bovino sobre o crescimento e a viabilidade celular, através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (ensaio PF-1). A concentração de inóculo utilizada foi de $7,5 \times 10^5$ células viáveis/mL, já que, como observado anteriormente, o cultivo das células S2AcGPV2 em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino com uma concentração de inóculo de 5×10^5 células viáveis/mL apresentou uma maior fase de adaptação. Além disso, a realização de vários ensaios simultâneos com uma concentração de 1×10^6 células/mL seria mais complexa devido à maior dificuldade de obtenção do número de células necessário para a preparação do inóculo. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.14.

Como se pode observar na Figura 5.14, houve crescimento celular em apenas dois dos meios de cultura, os meios 1 e 5. No restante dos ensaios, as células não conseguiram se desenvolver nos meios formulados. Nas formulações em que o nível de concentrado protéico de soro de leite era maior, a morfologia celular foi bastante afetada, apresentando uma intensa granulação, e altas taxas de morte foram observadas.

A análise dos contrastes obtidos no sexto dia de cultivo, calculados através do programa computacional Statistica, confirma este comportamento. Na Figura 5.15, verifica-se que o concentrado protéico e o *yeastolate* apresentaram efeitos negativos sobre a concentração e a viabilidade celular, com 90% de confiança. Um aumento da concentração destas variáveis levou a decréscimos na concentração de células e na viabilidade das células S2AcGPV2. Conforme esperado, o aumento do percentual de soro fetal bovino apresentou

um efeito positivo sobre as variáveis-resposta. A lactoalbumina hidrolisada não apresentou efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança.

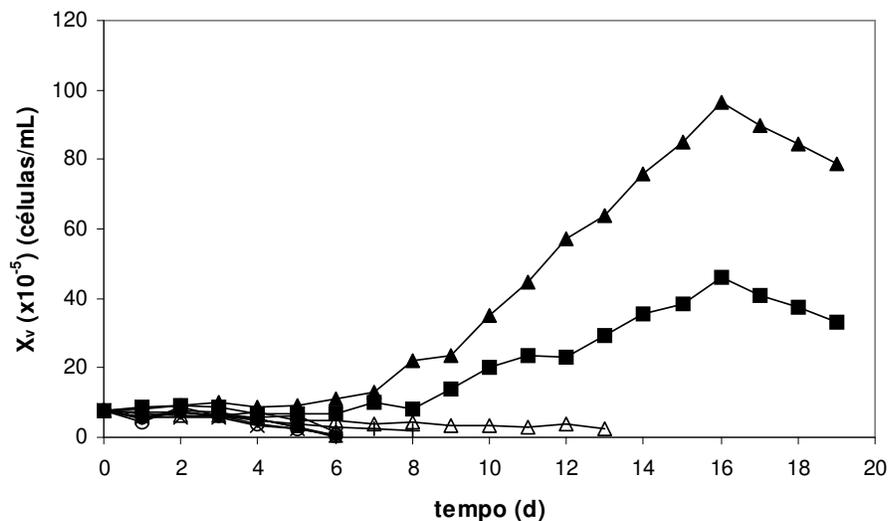


Figura 5.14. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com 4 replicatas no ponto central, nos quais foram avaliados os efeitos do concentrado protéico de soro de leite, do *yeastolate*, da lactoalbumina hidrolisada e do soro fetal bovino (ensaio PF-1). (■) Meio 1, (◇) meio 2, (△) meio 3, (×) meio 4, (▲) meio 5, (●) meio 6, (+) meio 7, (□) meio 8 e (○) meio 9.

As osmolalidades dos meios de cultura formulados foram determinadas para avaliar se as dificuldades de adaptação e crescimento poderiam estar associadas a este parâmetro, já que a adição dos vários nutrientes ao meio basal TC100 poderiam ter elevado excessivamente as osmolalidades destes meios de cultura, o que causaria um efeito negativo no crescimento celular. A Tabela 5.1 apresenta as formulações e as osmolalidades dos meios de cultura formulados neste ensaio.

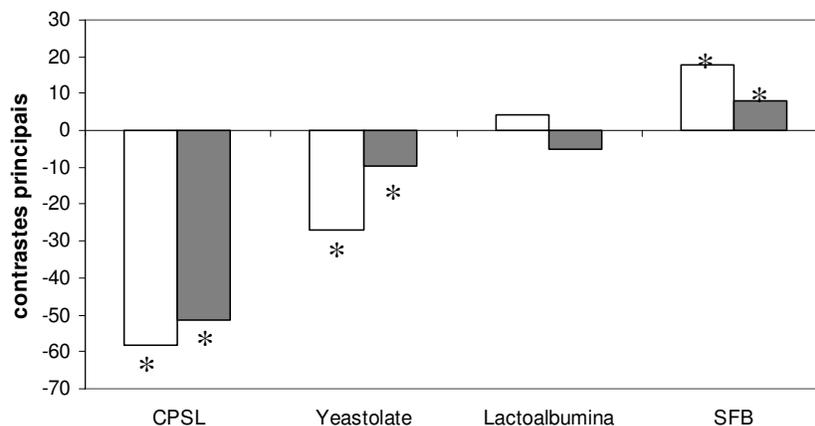


Figura 5.15. Contrastes principais obtidos para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (concentrado protéico do soro de leite, *yeastolate*, lactoalbumina hidrolisada e soro fetal bovino) sobre a concentração de células viáveis (\square 10^4 células/mL) e a viabilidade celular (\blacksquare %) no sexto dia de cultivo (ensaio PF-1). * contrastes estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 5.1. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} em que os efeitos da adição de concentrado protéico de soro de leite (CPSL), *yeastolate*, lactoalbumina hidrolisada e soro fetal bovino em meio TC100 foram estudados (ensaio PF-1).

Meio	CPSL (%)	<i>Yeastolate</i> (g/L)	Lactoalbumina (g/L)	SFB (%)	Osmolalidade (mOsm/Kg H ₂ O)
1	1	1	1	1	337
2	3	1	1	3	338
3	1	8	1	3	378
4	3	8	1	1	381
5	1	1	4	3	345
6	3	1	4	1	348
7	1	8	4	1	402
8	3	8	4	3	398
9	2	4,5	2,5	2	364

Verifica-se que os componentes que mais elevam a osmolalidade do meio de cultura são a lactoalbumina hidrolisada e, principalmente, o *yeastolate*. Isto ocorre devido ao alto conteúdo de compostos como aminoácidos livres, peptídeos, vitaminas e sais minerais presentes nestes hidrolisados que, quando suplementados a um meio de cultura, elevam sua osmolalidade. Comparando-se as osmolalidades dos meios 1 e 2 com as dos meios 3 e 4, nota-se que o aumento da concentração de *yeastolate* de 1 para 8 g/L acarretou um aumento de cerca de 42 mOsm/Kg H₂O. Já a elevação da concentração de lactoalbumina hidrolisada de 1 para 4 g/L elevou os valores de osmolalidades de cerca de 9 mOsm/Kg H₂O (meios 1 e 2 comparados aos meios 5 e 6). A presença das maiores concentrações de ambos os nutrientes fez com que a osmolalidade dos meios atingisse valores próximos a 400 mOsm/Kg H₂O (meios 7 e 8). A variação nas concentrações de concentrado protéico de soro de leite e de soro fetal bovino praticamente não alterou a osmolalidade dos meios de cultura, como pode ser visto comparando-se os meios que apresentam as mesmas concentrações de *yeastolate* e lactoalbumina e diferentes concentrações de concentrado e soro fetal. Entretanto, apesar de não elevar a osmolalidade do meio de cultura, a presença de 2 e 3% de concentrado ocasionou uma inibição do crescimento celular; as concentrações de 4,5 e 8 g/L de *yeastolate* também foram inibitórias, já que as células cresceram apenas nos meios que continham as menores concentrações destes componentes. A título de comparação, a osmolalidade do meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino é de 283 mOsm/Kg H₂O e a do meio SF900 II é de 383 mOsm/Kg H₂O.

Com este ensaio preliminar verificou-se que a adição de concentrado protéico de soro de leite em concentrações acima de 1% (m/v) mostrou-se não adequada ao cultivo das células S2AcGPV2 em meio TC100 suplementado com glicose, glutamina, *yeastolate*, lactoalbumina hidrolisada, soro fetal bovino e Pluronic F68 nas faixas de concentração estudadas. O aumento da concentração de *yeastolate* também apresentou um efeito negativo, mas em menor grau. Apenas em dois dos meios de cultura testados houve crescimento celular e, ainda assim, em apenas um deles a concentração máxima de células atingida foi maior que aquela obtida com o meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

5.7. Avaliação dos Efeitos da Adição de Concentrado Protéico de Soro de Leite, Soro Fetal Bovino e de uma Emulsão Lipídica no Crescimento e Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Completo 2³ (Ensaio PF-2)

Como o concentrado protéico de soro de leite e o *yeastolate* apresentaram efeitos negativos sobre a concentração e a viabilidade celular, realizou-se um ensaio em que o percentual do concentrado de soro de leite foi reduzido (0,1 a 1%) e o *yeastolate* foi substituído por uma mistura lipídica composta por Pluronic F68, Tween 80, ácidos graxos, tocoferol e colesterol (1 a 5%), na tentativa de suprir os componentes necessários para a adequada constituição das membranas celulares. A faixa de soro fetal bovino foi ampliada para 0,5 a 3%. A concentração de lactoalbumina hidrolisada foi mantida em 3,3 g/L, concentração presente no meio de cultura TNM-FH utilizado para o cultivo de células de insetos, já que esta variável não mostrou efeitos significativos nas faixas de concentração estudadas no experimento anterior. Apesar da análise dos efeitos ter mostrado que o *yeastolate* apresentou um efeito negativo sobre a concentração e a viabilidade celular na faixa estudada, sua concentração foi mantida em 8 g/L porque a observação visual das células mostrou que o efeito danoso estava mais relacionado ao concentrado protéico de soro de leite do que ao *yeastolate*. Além disso, a análise de efeitos, que deveria ter levado em consideração a concentração de células máxima obtidas em cada ensaio, foi realizada no sexto dia de cultivo, pois era o período em que ainda havia células viáveis em todos os cultivos, o que potencialmente influencia a análise dos resultados. O *yeastolate* é um suplemento bastante importante para o cultivo de células de inseto e a concentração de 8 g/L foi a concentração ótima encontrada por Drews *et al.* (1995) para o cultivo de células Sf9 de lepidópteros. Realizou-se, então, um planejamento fatorial completo 2³ (ensaio PF-2), e os resultados estão apresentados na Figura 5.16.

Como se observa na Figura 5.16, não houve crescimento celular significativo em nenhuma das formulações testadas neste ensaio, e novamente a morfologia celular foi novamente bastante afetada com a adição de concentrado protéico de soro de leite ao meio de cultura. As células apresentaram um pequeno crescimento (de $7,5 \times 10^5$ para 10×10^5 células/mL) em apenas duas das formulações de meio de cultura testadas, mostrando que, para estas células, os efeitos deletérios da adição de concentrado suplantam os benefícios do aumento da concentração de SFB.

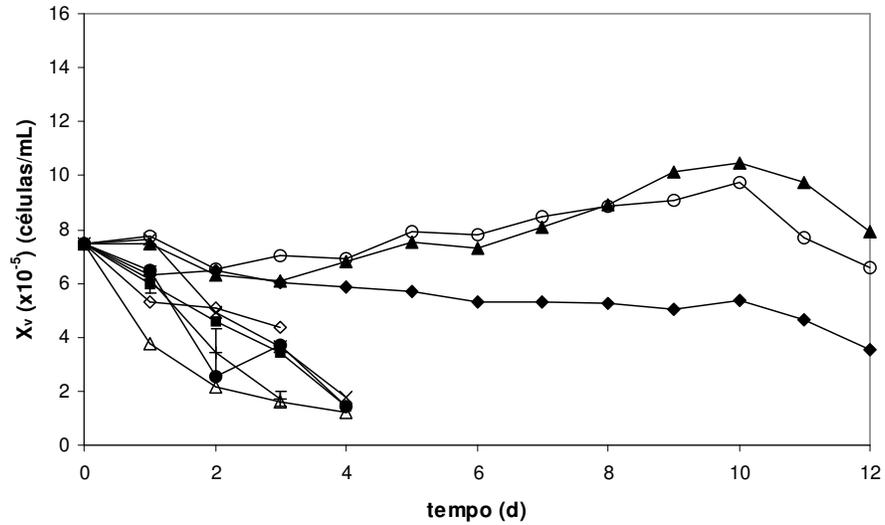


Figura 5.16. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, nos quais foram avaliados os efeitos do concentrado protéico de soro de leite, da emulsão lipídica e do soro fetal bovino (ensaio PF-2). (◆) Meio 10, (■) meio 11, (▲) meio 12, (×) meio 13, (△) meio 14, (●) meio 15, (○) meio 16, (◇) meio 17 e (+) meio 18.

Analisando-se os valores de osmolalidade (Tabela 5.2), verifica-se que todos os meios de cultura empregados neste segundo ensaio apresentaram osmolalidades superiores a 400 mOsm/Kg H_2O . Estes elevados valores podem ser atribuídos à presença de 3,3 g/L de lactalbumina e 8 g/L de *yeastolate*, conforme observado no ensaio anterior. Nota-se também que o aumento da concentração de lipídio de 1 para 5% elevou bastante a osmolalidade dos meios, passando de cerca de 400 para a faixa de 470 mOsm/Kg H_2O .

Não foi possível, então, o cultivo das células S2AcGPV2 com a adição de concentrado protéico de soro de leite ao meio de cultura, diferentemente do que foi observado por Batista e colaboradores (2003 e 2005), para o cultivo de células *Spodoptera frugiperda* Sf9, o que mostra que o comportamento e as necessidades nutricionais variam de acordo com a linhagem celular. O estudo realizado para as células Sf9 mostrou que o concentrado protéico de soro de leite, juntamente com extrato de levedura, pode substituir eficientemente o soro fetal bovino. Ramírez *et al.* (1990) também utilizaram leite e colostro com o objetivo de reduzir o percentual de soro fetal bovino no cultivo de um hibridoma

murino e verificaram que estes componentes podem promover o crescimento celular. A osmolalidade dos meios de cultura formulados neste ensaio também pode ter influenciado o desempenho das células, já que todos os valores foram superiores aos verificados no ensaio anterior.

Tabela 5.2. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo planejamento fatorial completo 2^3 em que os efeitos da adição de concentrado protéico de soro de leite (CPSL), soro fetal bovino e emulsão lipídica foram estudados (ensaio PF-2).

Meio	CPSL (%)	SFB (%)	Lipídio (%)	Osmolalidade (mOsm/Kg H₂O)
10	0,1	0,5	1	400
11	1,0	0,5	1	407
12	0,1	3,0	1	403
13	1,0	3,0	1	406
14	0,1	0,5	5	470
15	1,0	0,5	5	465
16	0,1	3,0	5	472
17	1,0	3,0	5	468
18	0,55	1,75	3	432

5.8. Avaliação dos Efeitos da Adição de *Yeastolate*, Soro Fetal Bovino e de uma Emulsão Lipídica no Crescimento e Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Completo 2^3 (Ensaio PF-3)

Com a não adequação do concentrado protéico de soro de leite para o cultivo das células S2AcGPV2, este componente foi eliminado do estudo. Através de um planejamento fatorial completo 2^3 (ensaio PF-3), foram realizados novos estudos sobre os efeitos da adição de *yeastolate*, soro fetal bovino e da emulsão lipídica. As faixas de estudo do *yeastolate* e do soro fetal bovino foram as mesmas empregadas no primeiro planejamento, 1

a 8 g/L e 1 a 3% (v/v), respectivamente. O percentual de emulsão lipídica utilizado variou de 1 a 5% (v/v). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.17.

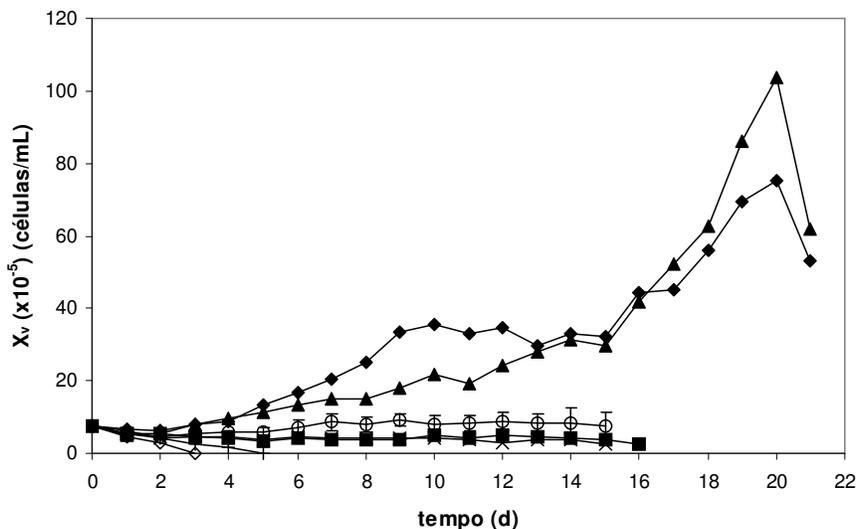


Figura 5.17. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, nos quais foram avaliados os efeitos do *yeastolate*, da emulsão lipídica e do soro fetal bovino (ensaio PF-3). (◆) Meio 19, (■) meio 20, (▲) meio 21, (×) meio 22, (△) meio 23, (●) meio 24, (+) meio 25, (◇) meio 26 e (○) meio 27.

Observou-se neste experimento que novamente houve crescimento celular em apenas dois dos cultivos (meios 19 e 21). Nos meios 20 e 22, a concentração de células diminuiu durante o cultivo. Nas culturas realizadas nos meios em que a concentração de lipídio era de 5% (meios 23 a 26), houve morte celular logo após a inoculação. Já nas culturas realizadas no meio relativo ao ponto central (meio 27), a concentração de células viáveis manteve-se próxima ao valor da concentração obtida após a inoculação durante todo o cultivo. Através da análise dos efeitos no 5º dia de cultivo, realizada pelo programa computacional Statistica, pode-se observar que o *yeastolate* apresentou um efeito negativo sobre a concentração de células, enquanto a emulsão lipídica mostrou efeito negativo sobre esta variável e também sobre a viabilidade celular (Figura 5.18). O *yeastolate* e a emulsão

lipídica mostraram um efeito sinérgico positivo sobre a concentração de células. O soro fetal bovino não mostrou um efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança nestas faixas de concentração testadas para estes componentes.

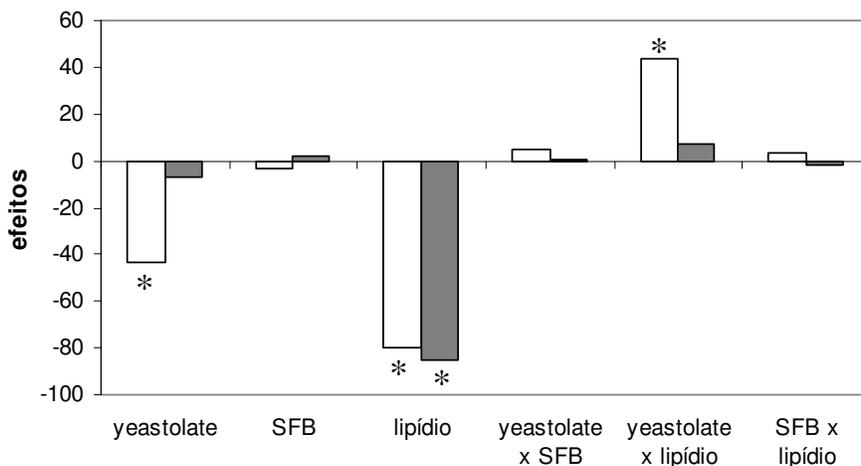


Figura 5.18. Efeitos obtidos para o planejamento fatorial completo 2^3 (yeastolate, emulsão lipídica e soro fetal bovino) sobre a concentração de células viáveis ($\square 10^4$ células/mL) e a viabilidade celular (\blacksquare %) no quinto dia de cultivo (ensaio PF-3). * efeitos estatisticamente significativos a 95% de confiança.

As células S2AcGPV2 desenvolveram-se apenas nas formulações 19 e 21, nos quais as osmolalidades eram de 355 e 360 mOsm/Kg H₂O (Tabela 5.3). Nos meios em que os valores de osmolalidades eram próximos ou acima de 400 mOsm/Kg H₂O, houve inibição do crescimento celular, como no ensaio anterior. Segundo Echaliier (1997), os meios de cultura utilizados para células de *Drosophila melanogaster* apresentam osmolaridades que variam de 330 a 440 mOsm. Já Wyss e Bachmann (1976) demonstraram que o valor de 400 mOsm/Kg H₂O é o valor limite deste parâmetro para o crescimento celular das linhagens de *Drosophila* Kc e Ca. Entretanto, não foi possível determinar um valor limite de osmolalidade para o cultivo da linhagem S2 com os dados obtidos neste trabalho, já que a inibição do crescimento pode ter sido causada pela composição dos diferentes suplementos e não pelo aumento da osmolalidade ocasionado por eles.

Tabela 5.3. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo planejamento fatorial completo 2³ em que os efeitos da adição de *yeastolate*, soro fetal bovino e emulsão lipídica foram estudados (ensaio PF-3).

Meio	<i>Yeastolate</i> (g/L)	SFB (%)	Lipídio (%)	Osmolalidade (mOsm/Kg H₂O)
19	1	1	1	355
20	8	1	1	401
21	1	3	1	360
22	8	3	1	399
23	1	1	5	425
24	8	1	5	462
25	1	3	5	423
26	8	3	5	468
27	4,5	2	3	409

Ao contrário do observado por Donaldson e Shuler (1998) para a linhagem de células de inseto BTI-Tn5B1-4, o aumento da concentração de lipídio não foi adequado ao crescimento das células S2AcGPV2. A suplementação da mistura lipídica em concentrações acima de 1% (v/v) em meio basal TC100 contendo *yeastolate*, SFB, glicose, glutamina, lactoalbumina hidrolisada e Pluronic F68 apresentou efeitos inibitórios para estas faixas de concentração estudadas. O *yeastolate* apresentou novamente um efeito negativo sobre o crescimento celular, o que não era esperado para a faixa de concentração estudada. No estudo realizado por Drews e colaboradores (1995), observou-se um aumento no crescimento da linhagem Sf9 quando a concentração de extrato de levedura passou de 4 para 8 g/L, e, apenas quando a concentração de extrato de levedura foi elevada para 16 g/L, uma inibição do crescimento foi observada. Outros estudos também mostram a grande influência deste composto sobre o crescimento celular (Wu e Lee, 1998; Wu *et al.*, 1998; Ikonomou *et al.*, 2001).

5.9. Avaliação dos Efeitos da Adição de *Yeastolate* e Soro Fetal Bovino no Crescimento e Viabilidade das Células S2AcGPV2 através de um Planejamento Fatorial Completo 2² (Ensaio PF-4)

Devido aos resultados obtidos com o planejamento anterior, realizou-se um novo ensaio no qual a concentração de lipídio foi mantida no nível mais baixo (1% v/v), a faixa de concentração de *yeastolate* foi reduzida para 1 a 3 g/L, e a faixa de variação de soro fetal bovino foi mantida (1 a 3% v/v). Para isso, foi realizado um planejamento fatorial completo 2² (ensaio PF-4). Como a osmolalidade dos meios de cultura apresentou valores bastante elevados nos ensaios anteriores, a lactoalbumina hidrolisada não foi utilizada nestes ensaios.

Neste experimento, verificou-se crescimento celular em todos os meios de cultura, conforme indica a Figura 5.19. Os cultivos nos quais a concentração de *yeastolate* era maior atingiram maiores concentrações de células. A Tabela 5.4 mostra os resultados de concentração máxima e os valores de viabilidade correspondentes obtidos com os cultivos nos diferentes meios de cultura.

Observando-se a Figura 5.19 e a Tabela 5.4, nota-se que todas as culturas apresentaram uma adaptação mais rápida aos meios de cultura testados quando comparadas aos ensaios anteriores. No meio 28, as células cresceram até o 7^o dia, entrando na fase estacionária a partir de então. A concentração máxima de células foi de cerca de $5,1 \times 10^6$ células/mL. No meio 29, o crescimento ocorreu até o 14^o dia, atingindo uma concentração celular máxima de $1,1 \times 10^7$ células/mL. No meio 30, as células começaram a crescer a partir da inoculação e pararam no 19^o dia, atingindo uma concentração de $8,5 \times 10^6$ células/mL. O meio 31 foi a formulação na qual foi obtida a maior concentração celular ($1,5 \times 10^7$ células/mL), com o crescimento ocorrendo até o 17^o dia. Em relação aos ensaios relativos ao ponto central, as culturas cresceram por cerca de 12 dias, entrando em fase estacionária após este período. A concentração máxima média obtida para as três replicatas foi de $8,0 \times 10^6$ células/mL.

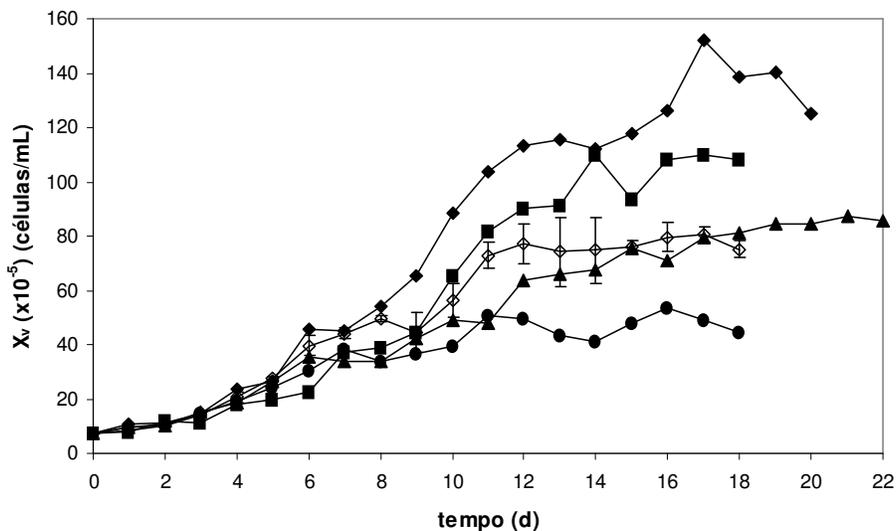


Figura 5.19. Cinéticas de crescimento obtidas para os ensaios realizados segundo o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais, nos quais foram avaliados os efeitos do *yeastolate* e do soro fetal bovino (ensaio PF-4). (●) Meio 28, (■) meio 29, (▲) meio 30, (◆) meio 31 e (◇) meio 32.

Tabela 5.4. Concentração celular máxima e viabilidade celular para os diferentes meios de cultura estudados através do planejamento fatorial completo 2^2 (*yeastolate* e soro fetal bovino) (ensaio PF-4).

Meio	<i>Yeastolate</i> (g/L)	SFB (%)	Concentração máxima de células (células/mL)	Viabilidade (%)
28	1	1	$5,1 \times 10^6$	94,1
29	3	1	$11,0 \times 10^6$	96,9
30	1	3	$8,5 \times 10^6$	94,4
31	3	3	$15,2 \times 10^6$	95,9
32	2	2	$8,0 \times 10^6$	92,9

A análise dos efeitos em relação às maiores concentrações obtidas em cada ensaio realizada pelo programa computacional Statistica mostrou que tanto o *yeastolate* quanto o soro fetal bovino apresentaram efeitos positivos sobre a concentração máxima de células a 95% de confiança (Figura 5.20). Um aumento na concentração destas variáveis ocasionou maiores concentrações celulares. As variáveis estudadas não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a viabilidade celular. Um efeito sinérgico entre o soro e o *yeastolate* também não foi observado sobre a concentração máxima de células e sobre a viabilidade celular.

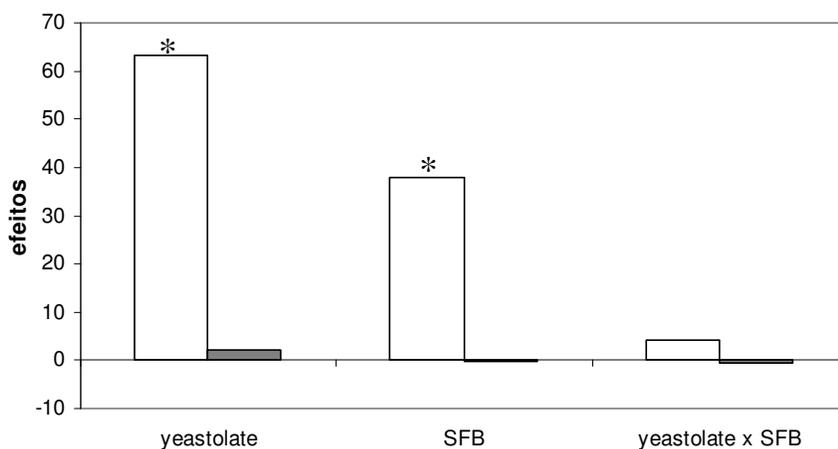


Figura 5.20. Efeitos obtidos para o planejamento fatorial completo 2^2 (*yeastolate* e soro fetal bovino) sobre a concentração máxima de células viáveis (□ 10^5 células/mL) e a viabilidade celular (■ %) (ensaio PF-4). * contrastes estatisticamente significativos a 95% de confiança.

A análise de variância (ANOVA) para a concentração máxima de células apresentada na Tabela 5.5 mostra que a regressão é capaz de explicar cerca de 91% da variação total e que a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de apenas 2,9, o que faz com que não seja possível a proposição de um modelo que descreva a concentração máxima de células em função da concentração de *yeastolate* e do percentual de soro fetal bovino nestas faixas estudadas. Para que o modelo fosse estatisticamente significativo e preditivo, o valor de

$F_{\text{calculado}}$ deveria ser no mínimo de quatro a cinco vezes maior que o valor de F_{tabelado} (Barros Neto *et al.*, 1995).

Tabela 5.5: Análise de variância (ANOVA) para a concentração máxima de células para o planejamento fatorial completo 2^2 (*yeastolate* e soro fetal bovino) (ensaio PF-4).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	$5,44 \times 10^{13}$	2	$2,72 \times 10^{13}$	20,4
Resíduos	$5,34 \times 10^{12}$	4	$1,33 \times 10^{12}$	
Falta de Ajuste	$3,53 \times 10^{11}$	2		
Erro Puro	$4,98 \times 10^{12}$	2		
Total	$5,98 \times 10^{13}$	6		

$F_{0,95;2;4} = 6,94$

% variação explicada (R^2) = 91,07

Todos os meios de cultura apresentaram valores de osmolalidades entre 360 e 380 mOsm/Kg H₂O (Tabela 5.6). A redução da faixa de concentração de *yeastolate* empregada, a manutenção do percentual de emulsão lipídica no nível mais baixo e a eliminação da lactoalbumina hidrolisada do meio de cultura contribuíram para a redução da osmolalidade. Mesmo com menores valores de concentração, o *yeastolate* foi o principal responsável pela variação da osmolalidade entre os meios.

Conforme já mencionado, há poucos dados na literatura sobre o cultivo de células *Drosophila melanogaster* S2. Em um experimento em batelada, Sondergaard (1996) cultivou células S2 transfectadas com o fator IX de coagulação sanguínea humano empregando o meio Schneider suplementado com 10% SFB. A concentração do inóculo era de 1×10^6 células/mL. O experimento foi realizado em um biorreator agitado com volume de 2 litros e, com quatro trocas de meio, as células atingiram uma concentração de $5,7 \times 10^7$ células/mL. O cultivo de uma linhagem S2 transfectada para a expressão de menin humana foi realizado por Valle e colaboradores (2001) em um frasco *spinner* com capacidade de 1 litro (600 mL de volume de trabalho), com uma concentração de inóculo de 1×10^6

células/mL. O meio de cultura empregado foi o HyQ SFX e as células atingiram uma densidade celular de 3×10^7 células/mL. Apesar de não ser possível uma comparação direta com os dados da literatura, já que os meios de cultura e os sistemas de cultivo são diferentes, os resultados mostram que, com a suplementação do meio basal TC100 com *yeastolate*, glicose, glutamina, emulsão lipídica e Pluronic F68, foi possível reduzir o percentual de soro bovino para valores de 1 a 3%, obtendo uma concentração celular máxima semelhante àquela obtida com o meio SF900 II (Figura 5.1).

Tabela 5.6. Formulações e osmolalidades dos meios de cultura testados no ensaio realizado segundo planejamento fatorial completo 2^2 em que os efeitos da adição de concentrado *yeastolate* e soro fetal bovino foram estudados (ensaio PF-4).

Meio	<i>Yeastolate</i> (g/L)	SFB (%)	Osmolalidade (mOsm/Kg H₂O)
28	1	1	360
29	3	1	379
30	1	3	365
31	3	3	379
32	2	2	366

O estudo mostrou também que, para as faixas de concentração estudadas neste último ensaio, o *yeastolate* apresentou uma grande influência sobre a concentração máxima de células e que, com um aumento da concentração deste composto, talvez seja possível a obtenção de maiores concentrações celulares finais e a eliminação do soro fetal bovino do meio de cultura.

5.10. Adaptação e Crescimento Celular nos Meios Formulados com Baixo Conteúdo de Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-3)

Como todas as formulações de meio de cultura do ensaio anterior foram adequadas para o crescimento celular, as células S2AcGPV2 foram adaptadas a estes meios de cultura e ensaios cinéticos foram realizados para avaliar o desempenho destas células em cada um

dos meios formulados naquele ensaio (meios 28 a 32) (ensaio CIN-3). Os resultados foram então comparados aos comportamentos obtidos com os meios TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino e SF900 II. A Figura 5.21 mostra os resultados obtidos para o crescimento (X_v) e a viabilidade celular, o consumo de glicose e glutamina e a produção de lactato, enquanto a Tabela 5.7 traz os dados de concentração máxima de células, velocidade específica de crescimento (μ), produtividade celular máxima e duração da fase lag.

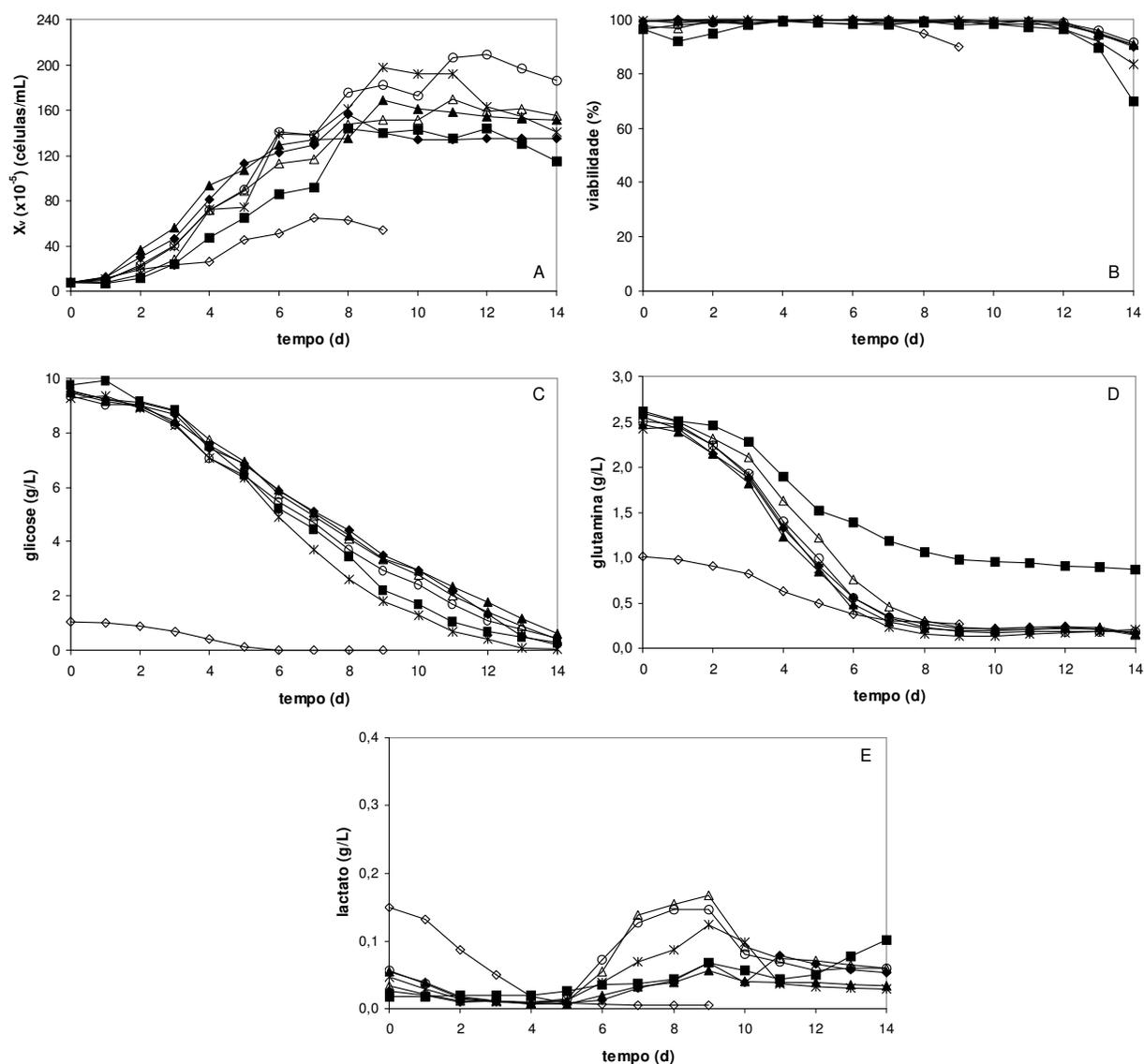


Figura 5.21 Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), glutamina (D) e lactato (E) para as células S2AcGPV2 adaptadas aos meios 28 (◆), 29 (△), 30 (▲), 31(○), 32 (*), TC100 (◇) e SF900 II (■) (ensaio CIN-3).

Tabela 5.7. Concentração máxima de células, velocidade específica máxima de crescimento, produtividade celular máxima e duração da fase lag obtidas para as células S2AcGPV2 adaptadas aos meios 28 a 32, TC100 suplementado com 10% de SFB e SF900 II (ensaio CIN-3).

Meio	Concentração celular máxima (células/mL)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Produtividade celular máxima (células/mL*h)	Duração da fase lag (h)
28	15,6x10 ⁶	0,025	7,7x10 ⁴	menor que 24
29	17,0x10 ⁶	0,031	6,1x10 ⁴	24
30	16,9x10 ⁶	0,030	7,5x10 ⁴	menor que 24
31	20,9x10 ⁶	0,027	7,0x10 ⁴	24
32	19,7x10 ⁶	0,027	8,8x10 ⁴	menor que 24
TC100 + 10% SFB	6,5x10 ⁶	0,016	3,4x10 ⁴	menor que 24
SF900 II	14,4x10 ⁶	0,027	7,1x10 ⁴	24

A adaptação das células aos meios de cultura 28 a 32 causou uma redução na duração da fase lag e um aumento na concentração máxima de células, quando comparados ao último ensaio no qual os mesmos meios foram empregados. Esta redução na duração da fase lag já era esperada, já que naquele caso as células não estavam adaptadas aos meios.

As células inoculadas nos meios 29, 31 e SF900 II apresentaram uma fase lag de cerca de 24 horas; no restante das culturas, a fase de adaptação foi ausente ou bastante curta (menor que 24 horas). As concentrações máximas de células obtidas foram bastante altas e maiores que aquelas atingidas pelas células cultivadas no meio rico SF900 II. Não houve diferença na densidade máxima de células entre as culturas realizadas nos meios 29 e 30, com 3 g/L de *yeastolate* e 1% de SFB e 1 g/L de *yeastolate* e 3% de SFB, o que mostra que o *yeastolate* é um substituto efetivo para o soro fetal bovino. A presença de uma maior concentração de soro causou apenas uma diminuição na fase lag. A maior concentração celular foi obtida com o meio 31, no qual estavam presentes as maiores concentrações de *yeastolate* e soro fetal bovino. Já em termos de produtividade celular, verifica-se que os

maiores valores foram obtidos para o meio 32, e, com exceção do meio 29, as produtividades em todos os meios formulados foram maiores que aquela obtida no cultivo no qual o meio SF900 II foi empregado. Em relação ao meio TC100, o número de células produzido por volume por unidade de tempo foi inferior a todos os outros meios. Apesar das concentrações máximas de células nos meios 29, 30 e 31 terem sido maiores que a atingida no meio 28, a produtividade celular neste último foi maior, já que neste cultivo as células atingiram a densidade máxima em um menor período de tempo.

De uma maneira geral, a glicose não foi o substrato limitante, já que havia uma alta concentração deste carboidrato nos meios de cultura, e os perfis de consumo foram similares para todas as culturas. Limitação por glicose foi observada apenas no cultivo em meio TC100, no qual, devido ao baixo nível inicial deste componente no meio de cultura, a glicose foi exaurida no 6^o dia e as células pararam de crescer após este momento. Os perfis de consumo de glutamina nos meios 28 a 32 foram bastante similares; este nutriente foi consumido rapidamente até o 7^o ou 8^o dia e, após este período, o nível manteve-se em cerca de 0,2 g/L até o final dos cultivos. Observa-se que a glutamina também não foi o substrato limitante, já que a interrupção do crescimento exponencial em todos os cultivos aconteceu quando ainda estavam presentes altos níveis deste nutriente nos meios de cultura. Nos meios TC100 e SF900 II não houve esgotamento de glutamina. Lactato foi produzido em baixas concentrações em todos os cultivos realizados nos meios formulados, mas o nível foi maior nos meios nos quais a concentração de *yeastolate* era maior. Nestes meios, o lactato produzido passou a ser consumido quando o nível de glicose atingiu de 2 a 3 g/L. O lactato residual presente no meio TC100 em função da adição de soro fetal bovino foi consumido juntamente com a glicose e, no meio SF900 II, a produção de lactato teve início no final do cultivo. A viabilidade celular manteve-se alta durante todo o cultivo nos diferentes meios, com exceção do cultivo em SF900 II, no qual a viabilidade apresentou uma pequena queda no início e depois se recuperou. As velocidades específicas máximas de crescimento foram iguais ou mais altas que as observadas para os cultivos nos meios TC100 e SF900 II. Estes ensaios mostraram que a suplementação do meio TC100 levou a uma melhora significativa no desempenho celular, mesmo com a redução do percentual de soro fetal bovino de 10 para valores de 1 a 3%.

5.11. Expressão da Glicoproteína do Vírus da Raiva pelas Células S2AcGPV2 Cultivadas nas Formulações 28 a 32 e nos Meios TC100 Suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e SF900 II

A produção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) pelas células S2AcGPV2 adaptadas aos meios 28 a 32 foi verificada para avaliar se, após a adaptação, as células ainda preservavam a capacidade de expressar esta glicoproteína. Foi realizado um cultivo estático e amostras para dosagem foram retiradas no 5º dia de cultivo, período em que todas as culturas estavam em fase exponencial de crescimento. Cultivos comparativos com os meios SF900 II e TC100 com 10% de soro fetal bovino também foram realizados. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.8. As concentrações de glicoproteína apresentadas são as dosadas no lisado celular, uma vez que a presença da proteína-alvo não foi detectada no sobrenadante.

Tabela 5.8. Produção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) pelas células adaptadas aos meios 28 a 32, TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino e SF900 II. Dosagens realizadas no lisado celular de amostras colhidas no 5º dia de cultivo.

Meio	GPV (ng/mL)	Teor de GPV (ng/10⁶ células)
28	4,0	0,7
29	8,0	1,4
30	4,5	0,6
31	9,0	1,2
32	6,0	0,7
TC100 + 10% SFB	5,0	1,4
SF900 II	11,7	1,4

Os resultados de dosagem de glicoproteína obtidos mostram que a adaptação das células S2AcGPV2 a diferentes meios de cultura não interferiu na capacidade de expressão destas células. Nas culturas foram detectados de 4 a 11,7 ng/mL de proteína. Os teores de GPV dos meios formulados 29 e 31 foram bem próximos àqueles encontrados para os

meios TC100 e SF900 II; já os verificados para os meios 28, 30 e 32 foram cerca de 50% menores. Estes valores mais baixos observados para estes meios necessitam de um melhor estudo com a realização de cinéticas de produção, já que a dosagem de glicoproteína foi realizada apenas para amostras coletadas no quinto dia de cultivo (em decorrência do elevado custo do método de quantificação), e a escolha deste período de coleta pode não ter sido a mais adequada.

Os resultados obtidos foram comparados a dados da literatura relativos à obtenção de outras proteínas recombinantes através do cultivo das células S2 (Tabela 5.9). Verifica-se que as concentrações de GPV obtidas são bastante inferiores à maioria dos dados encontrados, o mesmo acontecendo com os dados de teor de GPV, com exceção da produção de menin obtida por Valle e colaboradores (2001), que foi próxima à encontrada neste trabalho. Esta baixa produção de GPV pode estar associada à heterogeneidade da população de células S2AcGPV2, já que o fato destas células não se desenvolverem em baixa densidade não possibilitou a realização da etapa de clonagem, estimando-se que apenas 35% da população expresse a glicoproteína de interesse (Yokomizo, 2007). Além disso, o teste ELISA utilizado para a dosagem da proteína, único teste disponível no mercado, foi desenvolvido mais especificamente para a dosagem de partículas virais (não para a glicoproteína GPV), e seu uso para esta finalidade ainda estava sendo validado durante a realização desta etapa do trabalho.

Tabela 5.9. Dados da literatura sobre a produção de proteínas recombinantes através do cultivo das células S2.

Proteína	Concentração	Teor de GPV	Fonte
antígeno da superfície do vírus da hepatite B	7 µg/mL	-	Deml <i>et al.</i> , 1999a
tumstatina	7,8 µg/mL	46 µg/10 ⁶ células	Jeon <i>et al.</i> , 2003
eritropoietina	13 µg/mL	62 µg/10 ⁶ células	Lee <i>et al.</i> , 2000
endostatina	18 µg/mL	90 µg/10 ⁶ células	Park <i>et al.</i> , 2001
ciclooxigenase 2	15,3 µg/mL	16 µg/10 ⁶ células	Chang <i>et al.</i> , 2002
menin	18 ng/mL	0,9 ng/10 ⁶ células	Valle <i>et al.</i> , 2001

Apesar disso, os dados obtidos até o momento indicam que a adaptação das células aos diferentes meios formulados não alterou a capacidade de expressão das células e que produtividades similares à encontrada no meio SF900 II foram obtidas.

5.12. Remoção do Soro Fetal Bovino dos Meios de Cultura e Suplementação com Variadas Concentrações de *Yeastolate* (Ensaio CIN-4)

Diversos autores relatam o cultivo de células animais em meios livres de soro (Ramírez *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1996; Donaldson e Shuler, 1998; Doverskog *et al.*, 2000; Drews *et al.*, 2000; Heidemann *et al.*, 2000; Ikonomou *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002; Deparis *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*, 2003; Lua e Reid, 2003; Ballez *et al.*, 2004; Farrel e Iatrou, 2004; Sung *et al.*, 2004) e variadas formulações são disponíveis comercialmente. Como demonstrado anteriormente, as células S2AcGPV2 foram capazes de se desenvolver em meios com um pequeno percentual de soro fetal bovino no meio de cultura e a presença de *yeastolate* foi bastante importante para que isso acontecesse. Como a preocupação com a adição de soro fetal bovino e outros componentes de origem animal no cultivo de células animais é crescente, uma tentativa de cultivar esta linhagem na total ausência de SFB foi realizada. Para isto, realizou-se um ensaio no qual não foi adicionado soro fetal bovino e diferentes concentrações de *yeastolate* (1 a 7 g/L) foram testadas (ensaio CIN-4). Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.22 e 5.23 e na Tabela 5.10.

O cultivo das células S2AcGPV2 foi possível na ausência de soro fetal bovino, e o crescimento celular ocorreu em diferentes concentrações de *yeastolate*. Além disso, pode ser observado que um aumento na concentração de *yeastolate* causou um aumento da osmolalidade dos meios testados e que, com este aumento, a fase de adaptação celular foi maior. A osmolalidade dos meios de cultura atingiu 396 mOsm/Kg H₂O (meio com 7 g/L de *yeastolate*). As concentrações máximas de células aumentaram até a adição de 3 g/L de *yeastolate* no meio de cultura e, com o aumento na concentração deste suplemento, as concentrações de células atingidas foram menores. A produtividade celular obtida com o meio contendo 3 g/L de *yeastolate* foi bastante superior àquelas observadas com a adição de outras concentrações de *yeastolate* no meio de cultura. As viabilidades celulares em todos os cultivos foram mantidas acima de 90%. Em relação à velocidade específica de crescimento máxima, observou-se que os valores obtidos foram bastante similares, sendo

que a maior foi encontrada para o meio suplementado com 2 g/L de *yeastolate*. Visualmente, as células não apresentaram diferenças em sua morfologia quando comparadas a cultivos anteriores.

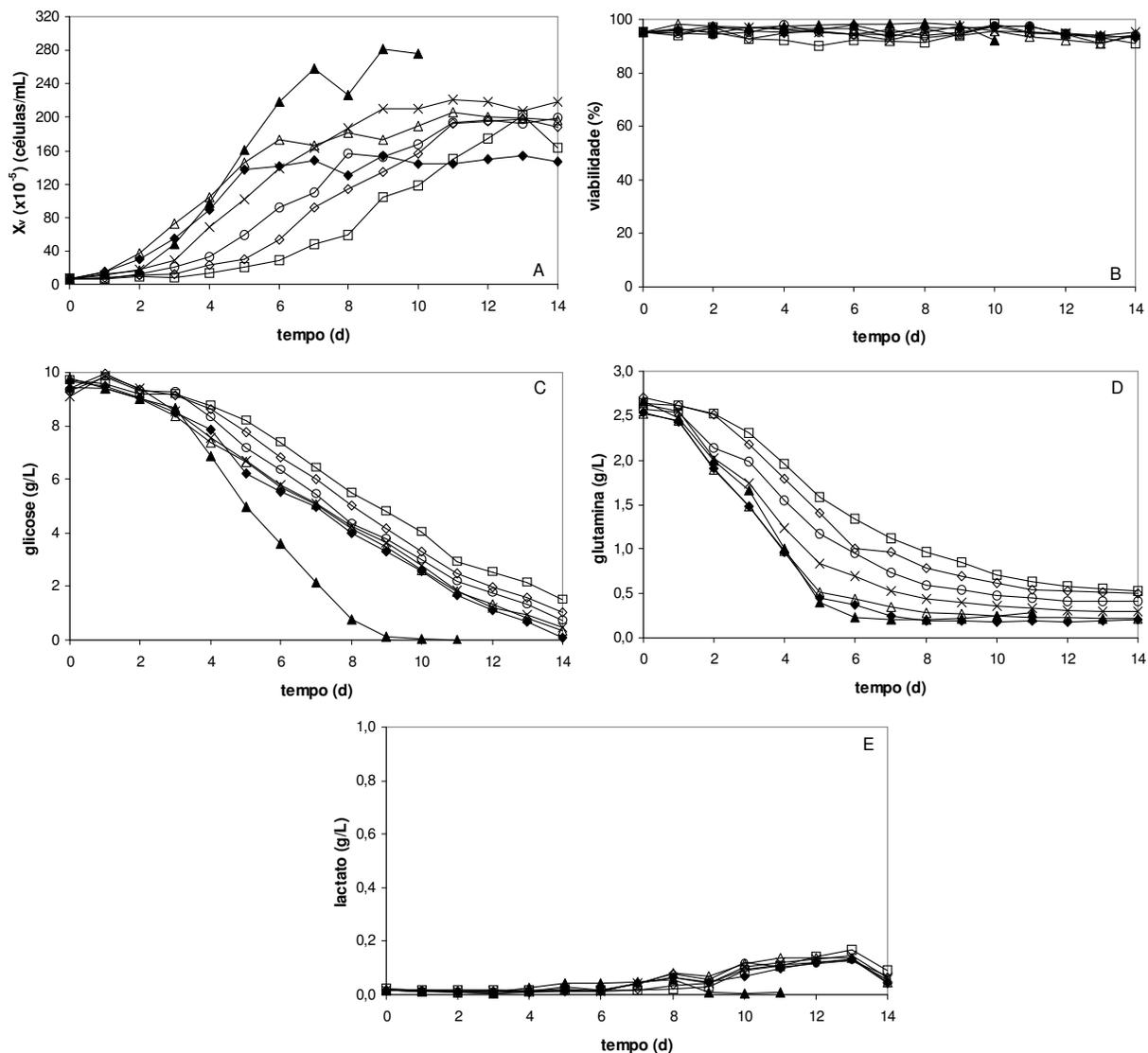


Figura 5.22. Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), glutamina (D) e lactato (E) para as células S2AcGPV2 cultivadas em meios livres de soro com 1 g/L (◆), 2 g/L (△), 3 g/L (▲), 4 g/L (×), 5 g/L (○), 6 g/L (◇) e 7 g/L (□) de *yeastolate* (ensaio CIN-4).

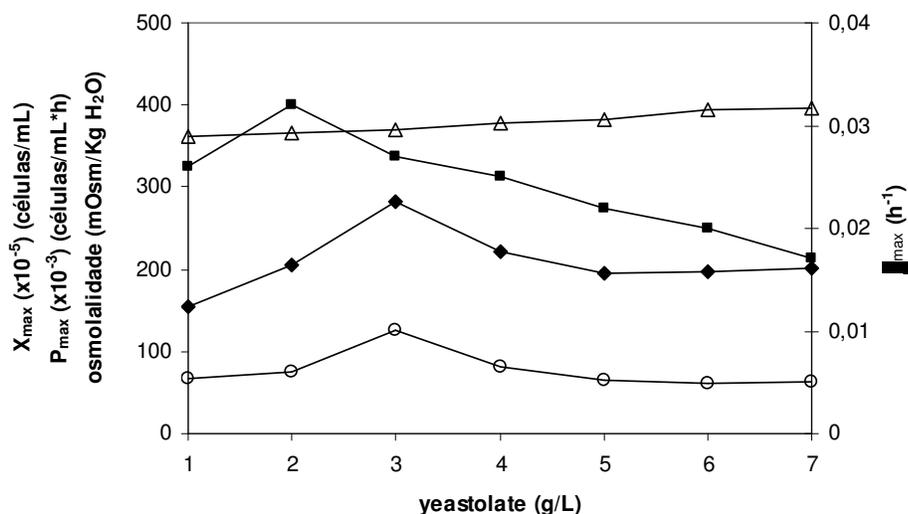


Figura 5.23. Concentração máxima de células (\blacklozenge), produtividade celular máxima (\circ), velocidade específica de crescimento (\blacksquare) e osmolalidade (\triangle) obtidas para diferentes concentrações de *yeastolate* no meio de cultura (ensaio CIN-4).

Tabela 5.10. Duração da fase lag e rendimento da produção de lactato em relação ao consumo de glicose obtidos para as células S2AcGPV2 cultivadas em meio livre de soro suplementado com 1 a 7 g/L de *yeastolate* (ensaio CIN-4).

<i>Yeastolate</i> (g/L)	Duração da fase lag (h)	$Y_{lac/glc}$ (g/g)
1	menor que 24	0,0130
2	menor que 24	0,0137
3	menor que 24	0,0043
4	menor que 24	0,0158
5	24	0,0139
6	48	0,0140
7	72	0,0191

Os perfis de consumo de glicose foram bastante próximos em todas as culturas, com exceção do cultivo no meio com 3 g/L. Com o aumento da concentração de *yeastolate*, ocorreu um atraso no consumo deste nutriente, pois as células mantinham-se por um maior período de tempo na fase de adaptação. Com este adiamento da entrada das células na fase exponencial de crescimento, é natural que haja este atraso no consumo de glicose, já que é neste período que a concentração de células começa a aumentar, elevando, conseqüentemente, o consumo de nutrientes. Na cultura com 3 g/L de *yeastolate*, o consumo de glicose no início do ensaio foi similar aos verificados nos outros cultivos, porém, a partir do 4^o dia, este carboidrato foi rapidamente consumido, provavelmente devido à maior concentração celular presente, sendo exaurido no 9^o dia.

Os perfis de consumo de glutamina foram bem similares entre os cultivos, notando-se apenas um atraso no consumo deste nutriente e uma maior concentração residual no final do cultivo conforme o aumento da concentração de *yeastolate*. Como ocorrido para a glicose, este comportamento também está relacionado ao aumento da duração da fase lag causado por este suplemento. Para os meios contendo 1 a 3 g/L, a glutamina foi consumida até o 6^o ou 7^o dia e, após isso, a concentração se manteve em cerca de 0,2 g/L. No restante dos meios, a concentração final foi de no mínimo 0,3 g/L (meio suplementado com 4 g/L de *yeastolate*).

Lactato começou a ser produzido em concentrações muito baixas, quando o nível de glicose estava entre 4 e 7 g/L, e consumido quando a concentração deste carboidrato atingiu cerca de 2 g/L. Dados de rendimento da produção de lactato em função do consumo de glicose mostram que este metabólito quase não é produzido por estas células, indicando que as células de *Drosophila melanogaster* possuem o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (Ciclo TCA) bastante funcional, com uma completa oxidação da glicose para a produção de energia, como ocorre para células de Sf9 de lepidópteros (Ikonomou *et al.*, 2003). As células de inseto utilizam os carboidratos com maior eficiência quando comparadas às células de mamíferos, já que a produção de lactato por estas células é bastante superior.

Os resultados obtidos mostram que, com exceção da velocidade específica de crescimento, os melhores parâmetros de cultivo, como concentração máxima de células e produtividade celular (P_{max}), foram obtidos com a adição de 3 g/L no meio de cultura (Figura 5.23). Apesar das células cultivadas no meio com 2 g/L de *yeastolate* terem

apresentado a maior velocidade específica de crescimento, o desempenho das células no meio de cultura contendo 3 g/L deste composto foi também bastante adequado.

A tentativa de remover completamente o soro fetal bovino do meio de cultura através da adição de nutrientes, em especial o *yeastolate*, foi realizada com sucesso, com as células atingindo altas densidades, bem acima daquelas obtidas com os meios comumente utilizados para seu cultivo. A variação na concentração de *yeastolate* acarretou diferentes perfis de crescimento, principalmente no que diz respeito à fase lag. A longa duração desta fase relacionada ao aumento da concentração de *yeastolate* pode ser contornada pela adaptação das células a estes meios.

5.13. Efeito da Adição do Hidrolisado de Soja Hy Soy como Substituto do Soro Fetal Bovino (Ensaio CIN-5)

O efeito da adição de hidrolisado de soja no crescimento celular também foi avaliado, já que este composto apresentou bons resultados quanto ao crescimento celular e à obtenção de bioprodutos (Donaldson e Shuler, 1998; Heidemann *et al.*, 2000) e apresenta um custo um pouco inferior ao do *yeastolate*. O Hy Soy é uma fonte de peptídeos produzidos pela hidrólise enzimática da soja, possuindo também um alto teor de carboidratos. Para uma comparação direta dos resultados com aqueles obtidos com a adição de *yeastolate*, realizou-se um ensaio similar ao anterior, no qual soro fetal bovino não foi adicionado ao cultivo e diferentes concentrações de Hy Soy foram utilizadas (1 a 7 g/L) (ensaio CIN-5), valores idênticos aos de *yeastolate* utilizados no último ensaio. As Figuras 5.24 e 5.25 e a Tabela 5.11 mostram os resultados obtidos.

Como verificado com a adição de *yeastolate*, as células foram capazes de se desenvolver em meios livres de soro suplementados com Hy Soy, mas o efeito apresentado por este hidrolisado sobre o crescimento celular foi muito aquém do observado para a adição de *yeastolate* (Figura 5.22). Para as mesmas condições, as concentrações máximas de células atingidas nos meios suplementados com *yeastolate* foram de 2 a 7 vezes maiores que as encontradas com a suplementação de Hy Soy. Este maior efeito promotor do crescimento verificado para o *yeastolate* poderia ser atribuído ao fato deste composto ser uma fonte de vitaminas, principalmente as do complexo B. Entretanto, segundo Wu e Lee (1998), em um cultivo de células de inseto Sf9, as vitaminas contribuíram muito pouco para

o efeito promotor do crescimento apresentado por este hidrolisado. Uma outra hipótese seria a presença de peptídeos no *yeastolate* diferentes daqueles presentes no hidrolisado de soja, que podem desempenhar o papel de fatores de crescimento de baixa massa molar e hormônios.

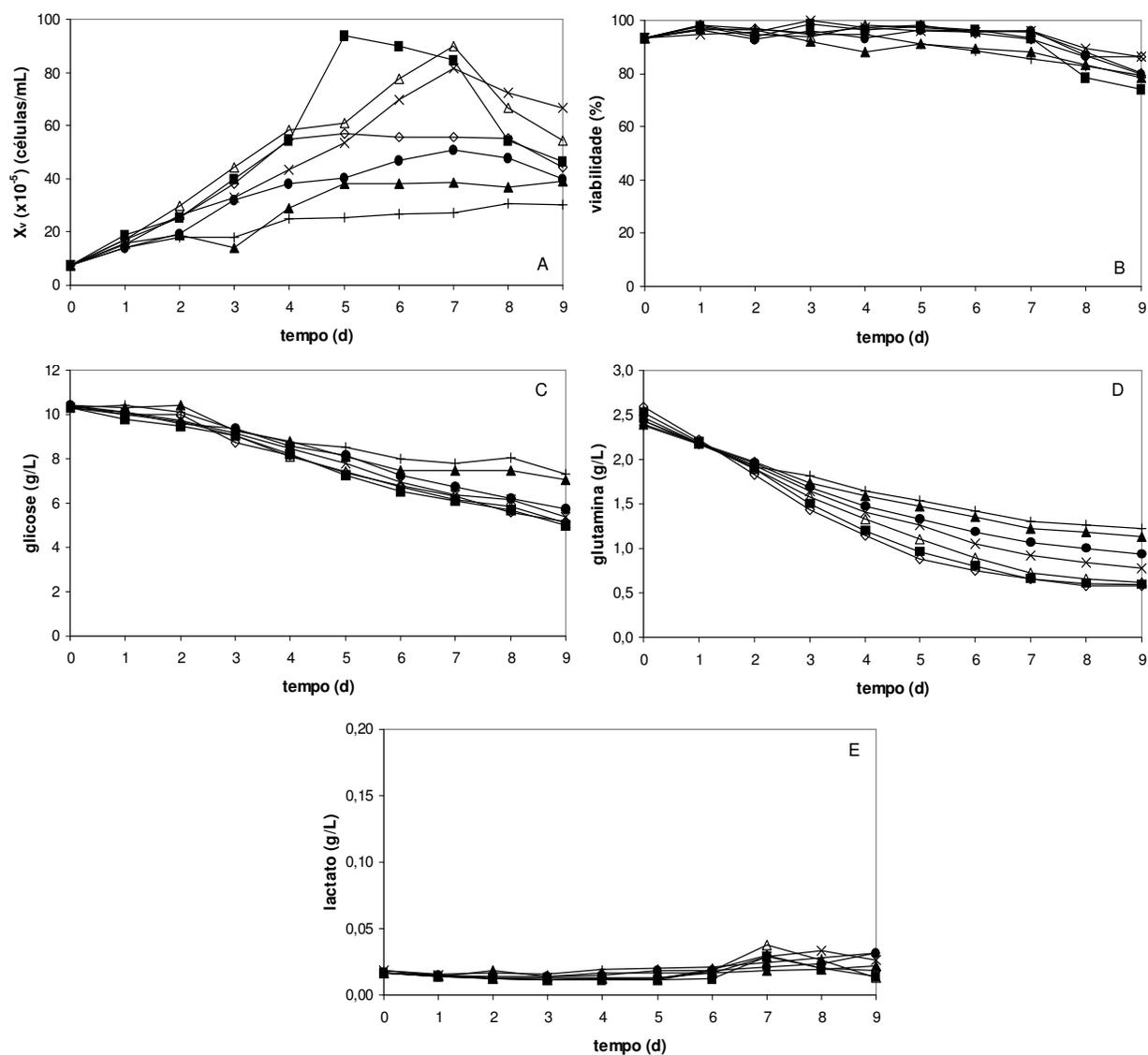


Figura 5.24. Concentração de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), glutamina (D) e lactato (E) obtidas para as células S2AcGPV2 cultivadas em meios livres de soro com (◇) 1 g/L, (■) 2 g/L, (△) 3 g/L, (×) 4 g/L, (●) 5 g/L, (▲) 6 g/L e (+) 7 g/L de Hy Soy (ensaio CIN-5).

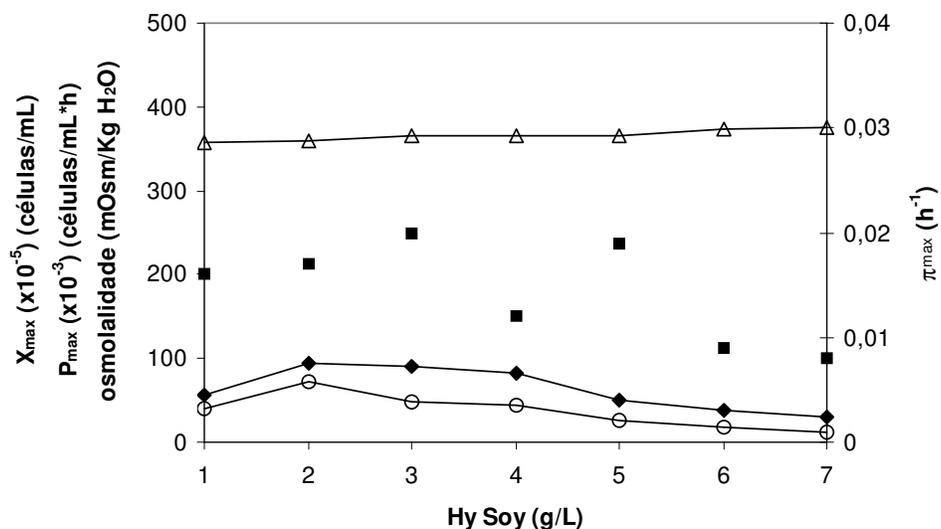


Figura 5.25. Concentração máxima de células (\blacklozenge), produtividade celular máxima (\circ), velocidade específica de crescimento (\blacksquare) e osmolaridade (\triangle) obtidas para diferentes concentrações de Hy Soy no meio de cultura (ensaio CIN-5).

Tabela 5.11. Duração da fase lag e rendimento da produção de lactato em relação ao consumo de glicose obtidos para as células S2AcGPV2 cultivadas em meio livre de soro suplementado com 1 a 7 g/L de Hy Soy (ensaio CIN-5).

Hy Soy (g/L)	Duração da fase lag (h)	$Y_{lac/glc}$ (g/g)
1	menor que 24	0,0032
2	menor que 24	0,0029
3	menor que 24	0,0050
4	menor que 24	0,0036
5	menor que 24	0,0032
6	menor que 24	0,0015
7	menor que 24	0,0047

Neste ensaio, as maiores densidades celulares foram obtidas com os meios que continham de 2 a 4 g/L de Hy Soy. A adição de maiores concentrações deste hidrolisado acarretou uma progressiva diminuição na concentração e na produtividade celular máxima, porém, também não foram notadas diferenças na morfologia celular. Apesar do baixo crescimento, a adaptação celular foi bem mais rápida que no caso dos meios suplementados com *yeastolate*, e as células começaram a crescer logo após a inoculação em todos os meios de cultura. As menores fases de adaptação apresentadas por estas células podem estar relacionadas aos menores valores de osmolalidade dos meios de cultura, já que, nos cultivos com suplementação de *yeastolate*, as fases lag também foram inferiores a 24 horas nas formulações com osmolalidade menor que 378 mOsm/Kg H₂O. As produtividades celulares também foram menores que as obtidas para os cultivos nos meios contendo *yeastolate*, com exceção da obtida com o meio suplementado com 2 g/L de Hy Soy. Já a viabilidade celular foi um pouco mais baixa que a verificada nos cultivos com *yeastolate*, mantendo-se, entretanto, acima de 80% durante todo o cultivo para os diferentes meios. Os valores de osmolalidade dos meios de cultura estavam dentro da faixa aceitável para o crescimento adequado das células S2AcGPV2 e foram mais baixos que os encontrados para as formulações contendo *yeastolate*, o que pode, talvez, ser devido a uma menor complexidade do hidrolisado de soja.

Na Figura 5.24, observa-se que o consumo de glicose foi muito baixo em todos os cultivos. Ao contrário do observado no ensaio com diferentes concentrações de *yeastolate*, não houve um atraso no consumo de glicose, já que a fase de adaptação celular apresentada pelas culturas foi bastante curta. Notou-se apenas que, com o aumento da concentração de Hy Soy, a concentração residual de glicose também aumentou, pois com o menor número de células presente nas culturas, menor foi o consumo deste nutriente. Comportamento similar também foi observado para o consumo de glutamina, que também não se esgotou durante os cultivos. A concentração de lactato manteve-se em níveis bastante baixos durante todo o cultivo e, como verificado no ensaio anterior, a conversão de glicose em lactato foi bastante baixa.

Os melhores resultados em termos de concentração e produtividades máximas de células (P_{max}) foram obtidos com a formulação de meio de cultura na qual 2 g/L de Hy Soy foram adicionados, sendo que o valor da osmolalidade deste meio também era adequado para o cultivo das células S2AcGPV2 (Figura 5.25). Entretanto, as mais altas velocidades

específicas de crescimento foram obtidas nos cultivos nos meios suplementados com 3 e 5 g/L de hidrolisado de soja.

A suplementação com 2 a 4 g/L de hidrolisado de soja levou a um aumento da concentração máxima de células em comparação com o meio TC100 suplementado apenas com 10% de soro fetal bovino, mas as densidades obtidas foram bem menores que aquelas verificadas com o meio SF900 II e com os meios formulados nos ensaios anteriores, mostrando que o *yeastolate* é um suplemento mais eficiente para o crescimento celular e para a obtenção de altas densidades celulares.

5.14. Adaptação e Crescimento Celular na Formulação de Meio de Cultura Encontrada como a mais Adequada para o Crescimento das Células S2AcGPV2 (Ensaio CIN-6)

Como o *yeastolate* mostrou-se ser um suplemento de meio de cultura mais eficiente que o hidrolisado de soja, as células S2AcGPV2 foram adaptadas à formulação de meio de cultura que se mostrou mais adequada para o cultivo destas células, formulação esta livre de soro e suplementada com 3 g/L de *yeastolate*, para avaliar o comportamento celular após variadas passagens sucessivas neste meio (ensaio CIN-6). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.26.

Com a adaptação das células ao meio formulado, a densidade celular máxima atingida foi bastante inferior àquela obtida quando células não adaptadas foram cultivadas no mesmo meio (Figura 5.22), atingindo cerca de $10,7 \times 10^6$ células/mL, e a velocidade específica de crescimento foi de cerca de $0,050 \text{ h}^{-1}$. A produtividade celular máxima foi de $13,3 \times 10^4$ células/mL*h, valor similar ao verificado com as células não adaptadas (Figura 5.23). A fase de adaptação apresentada pela cultura foi inferior a 24 horas. A viabilidade celular manteve-se alta durante todo o ensaio. A glicose foi consumida durante todo o cultivo, mas não houve esgotamento deste nutriente, já que a concentração residual no meio de cultura foi de 5,8 g/L, mostrando que este composto não foi o responsável pela entrada da cultura na fase estacionária de crescimento. Lactato manteve-se em baixas concentrações, sendo produzido apenas no final do cultivo, quando atingiu a concentração de 0,13 g/L.

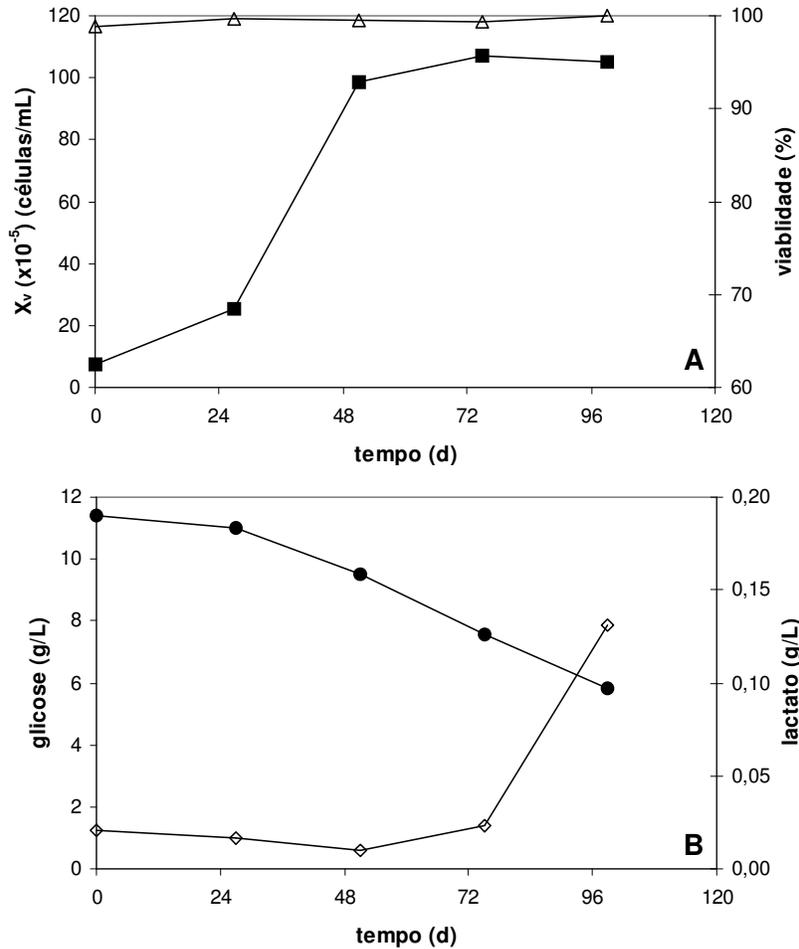


Figura 5.26. (A) Concentração de células viáveis (■) e viabilidade celular (Δ). (B) Concentrações de glicose (●) e lactato (\diamond). Dados obtidos para as células S2AcGPV2 adaptadas ao meio livre de soro suplementado com 3 g/L de *yeastolate* (ensaio CIN-6).

Paralelamente a este ensaio, um outro cultivo nas mesmas condições foi realizado para que a dosagem da glicoproteína do vírus da raiva fosse realizada, já que o volume de cultura empregado no frasco *schott* não permite que sejam retiradas amostras para todas as dosagens necessárias (glicose, lactato, glutamina e produto). Na Figura 5.27, observa-se que o crescimento celular foi bastante próximo ao cultivo anterior, com as células atingindo uma concentração máxima de $11,3 \times 10^6$ células/mL e uma produtividade máxima de $10,7 \times 10^4$ células/mL*h. A velocidade específica de crescimento foi de cerca de $0,045 \text{ h}^{-1}$.

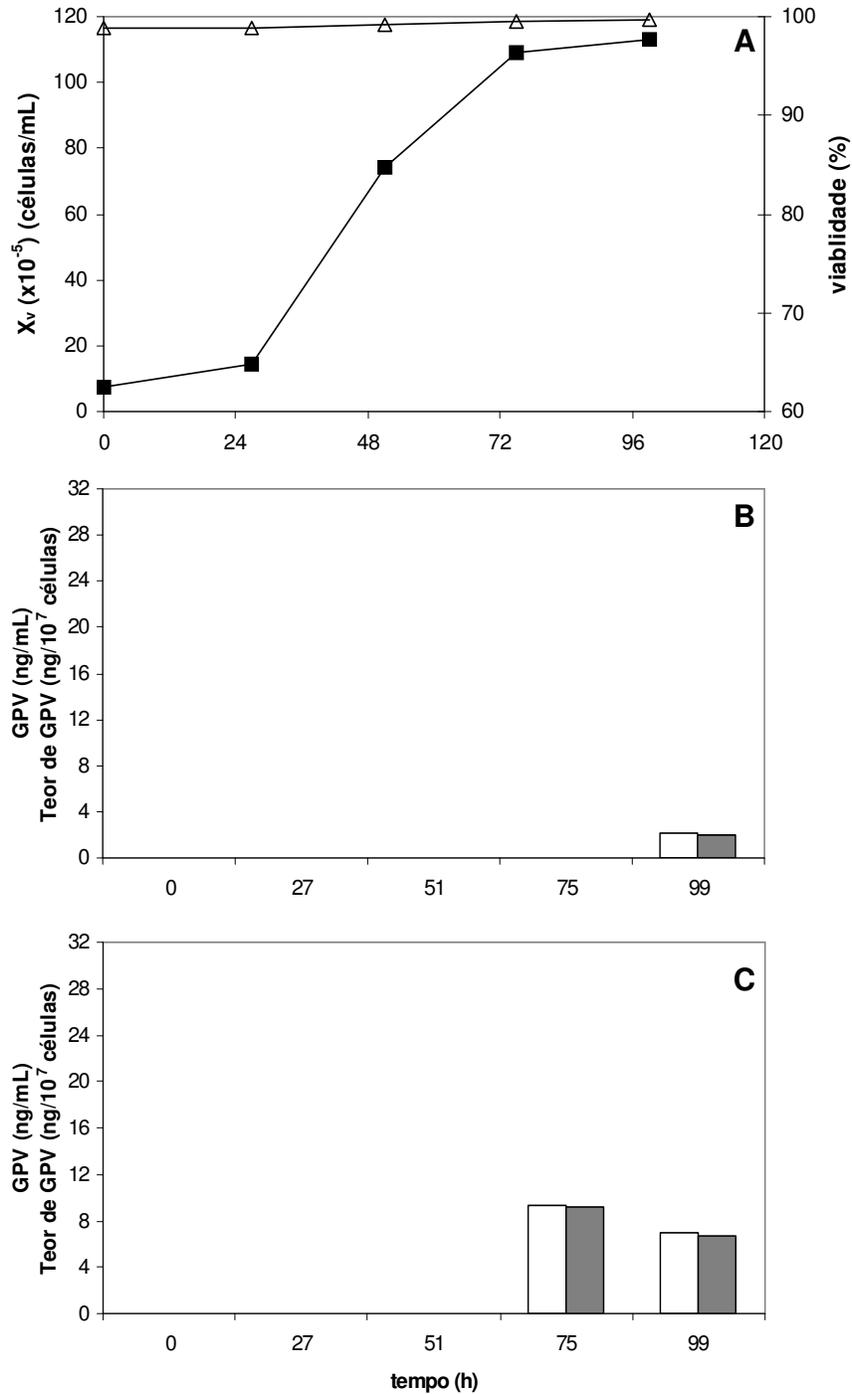


Figura 5.27. (A) Concentração de células viáveis (■) e viabilidade celular (Δ), concentração de GPV (□) e teor de GPV (■) obtidos no sobrenadante (A) e no lisado celular (B) para ensaio realizado em frascos *schott*, empregando-se meio livre de soro suplementado com 3 g/L de *yeastolate* (ensaio CIN-6).

Neste ensaio, as dosagens de proteína foram realizadas com 75 e 99 horas de cultivo. Observa-se que, no sobrenadante, a glicoproteína foi detectada em pequenas concentrações (cerca de 2,1 ng/mL) apenas após 99 horas de cultivo. A detecção de GPV no sobrenadante no final do cultivo pode ser devido à presença de fragmentos de membrana celular no sobrenadante, pois, nesta etapa, verifica-se o acúmulo de células rompidas, e esta proteína não é secretada para o sobrenadante, já que é uma proteína de membrana e o vetor transfectado nas células não possui uma sequência sinal de secreção. Por outro lado, as análises realizadas no lisado celular mostram que, em 75 horas, cerca de 9,4 ng/mL de GPV foram detectados, e, com 99 horas, o nível de proteína caiu para cerca de 7,0 ng/mL. O teor de GPV foi baixo, de cerca de 8,6 ng/10⁷ células em 75 horas e 6,2 ng/10⁷ células em 99 horas. A queda na concentração de proteína no período final do cultivo pode ser potencialmente atribuída ao maior número de células apoptóticas ou mesmo mortas ao final do cultivo, com a provável liberação de proteases, que atuariam degradando a proteína alvo. Além disso, esta queda na concentração de proteína pode estar também relacionada à produção de lactato no final do cultivo. Dados da literatura mostram que esta glicoproteína sofre mudanças conformacionais, perdendo sua forma nativa, em pH ácido (Gaudin *et al.*, 1993; Gaudin, 1997; Maillard e Gaudin, 2002), o que pode ter interferido na dosagem desta pelo método ELISA.

A expressão da glicoproteína do vírus da raiva pelas células S2AcGPV2 nesta formulação de meio de cultura foi também verificada através da realização de um ensaio de imunofluorescência com as células cultivadas por 72 horas. Na Figura 5.28A, que mostra uma cultura de células transfectadas, observa-se que diversas células apresentam vários pontos fluorescentes (devido à fluorescência do conjugado GPV/anticorpo anti-GPV), o que não ocorre com as células selvagens (Figura 5.28B). Como o anticorpo empregado é específico para a forma trimérica da proteína, os resultados mostram não apenas que este meio de cultura proporciona a expressão da glicoproteína, mas também sua expressão na forma imunogênica.

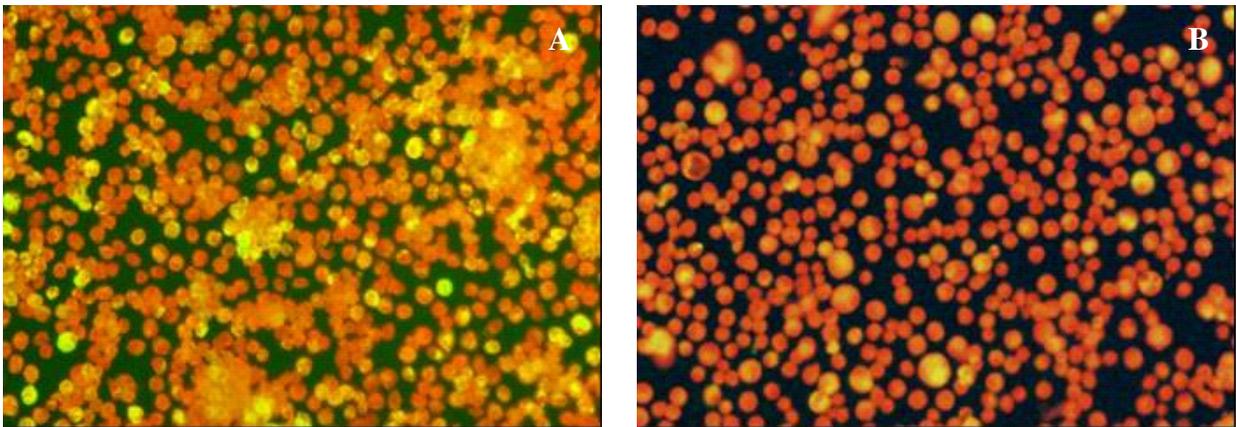


Figura 5.28. Imunofluorescência das células S2AcGPV2 (A) e das células S2 selvagens (B) (ensaio CIN-6).

Apesar da obtenção de uma menor densidade de células, o meio formulado é bastante viável para o cultivo das células S2AcGPV2, pois as células foram capazes de expressar a glicoproteína em sua conformação trimérica e, em comparação com o meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino, uma maior concentração celular foi obtida, com a vantagem do meio de cultura formulado não necessitar da suplementação de soro fetal bovino, facilitando o aumento de escala e o processo de purificação desta proteína. Uma estimativa de custo mostra que o valor deste meio de cultura (US\$67,31 por litro) é um pouco superior ao do meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino (US\$57,74 por litro) e inferior ao do meio SF900 II (US\$87,00 por litro).

5.15. Ensaio em Biorreator (Ensaio RE-1, RE-2 e RE-3)

Após a avaliação do crescimento celular na formulação de meio de cultura selecionada em menor escala, realizaram-se ensaios em biorreator para avaliar o crescimento das células S2AcGPV2 e a produção da glicoproteína em maior escala. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.29.

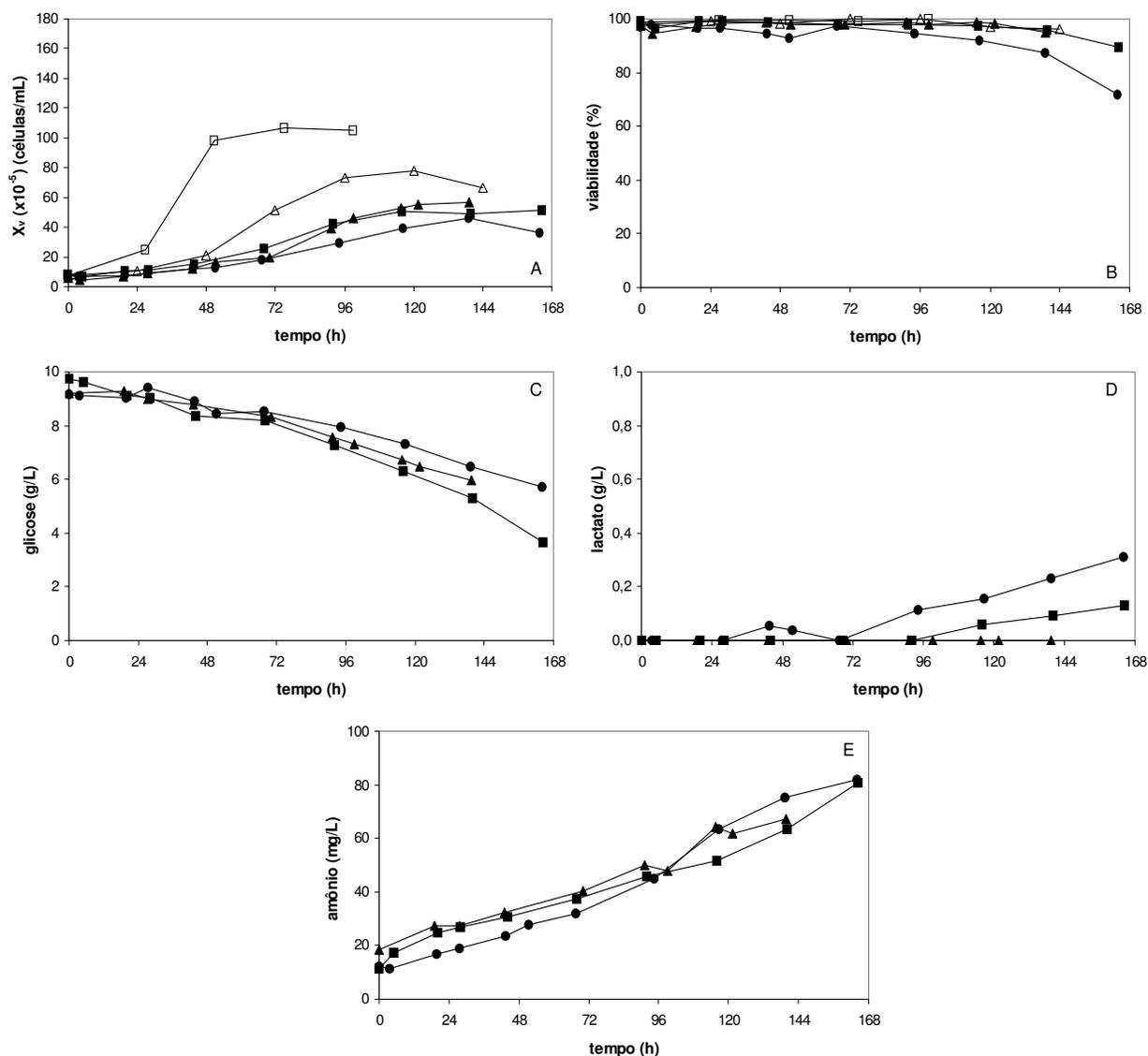


Figura 5.29. Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), lactato (D) e amônio (E) obtidas para os ensaios RE-1 (●), RE-2 (■) e RE-3 (▲) em biorreator e para os ensaios em paralelo de acompanhamento em frascos *schott* SC-2 (□) e SC-3 (△).

No ensaio RE-1, nota-se que, após a inoculação, a cultura apresentou uma fase lag de cerca de 20 horas. A partir de então, as células entraram em fase exponencial de crescimento, com velocidade específica de $0,018 \text{ h}^{-1}$, e atingiram a concentração máxima de $4,64 \times 10^6$ células viáveis/mL em 139 horas de cultivo. A partir deste momento, o número de células viáveis e de células totais diminuiu. A viabilidade celular manteve-se acima de 90%

durante quase toda a duração do ensaio, e o pH do cultivo manteve-se próximo a 6,0 durante todo o cultivo.

Comparando-se os resultados deste ensaio com aqueles comumente obtidos em frascos *schott* (ensaio CIN-6), observa-se que o crescimento celular e a velocidade específica de crescimento apresentaram valores significativamente menores. Durante o ensaio em reator, observou-se a presença de células fragmentadas na cultura, o que pode ter sido causado pela taxa de agitação relativamente alta.

Com a redução na velocidade de agitação (ensaio RE-2), observa-se que o cultivo apresentou uma menor fase de adaptação, de cerca de 10 horas, e a concentração máxima de células atingida foi bastante similar àquela obtida anteriormente ($5,0 \times 10^6$ células/mL), o mesmo ocorrendo para a velocidade específica de crescimento, que apresentou valor de $0,021 \text{ h}^{-1}$. A viabilidade celular manteve-se acima de 90% durante todo o cultivo, e o pH da cultura, com valor inicial de 6,3, subiu um pouco no início, atingindo 6,36 e voltando a cair a um valor de 6,18 no término do cultivo.

Apesar da diminuição da velocidade de agitação ter contribuído para a não observação de fragmentos de células durante o cultivo, a concentração máxima de células foi similar à do ensaio anterior e bastante inferior àquela atingida pelo mesmo inóculo em frasco tipo *schott* (ensaio SC-2). A concentração máxima de células atingida foi o dobro da obtida no biorreator ($1,07 \times 10^7$ células viáveis/mL), e a velocidade específica, de $0,050 \text{ h}^{-1}$ (2,4 vezes superior). A viabilidade celular também se manteve alta durante todo o cultivo.

Como as diferenças observadas entre os ensaios em biorreator e em frasco *schott* continuaram significativas com a alteração da taxa de agitação, outras modificações foram realizadas na tentativa de melhorar o desempenho desta linhagem em um cultivo em biorreator. Um tipo de pá de fluxo axial, mais adequado para o cultivo de células animais já que proporciona menores tensões de cisalhamento, foi utilizado, e a taxa de agitação foi reduzida. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 30%, já que, em ensaios em frascos *schott*, efetua-se a abertura do frasco para retirada de amostra e conseqüente troca de ar apenas uma vez ao dia, o que provavelmente faz com que a concentração de O_2 permaneça em níveis bastante baixos durante parte do cultivo. Ar sintético medicinal ao invés do ar comprimido também foi utilizado, minimizando a possibilidade de ocorrência de toxicidade devido ao ar empregado.

Apesar de todas estas modificações realizadas, verificou-se neste ensaio (RE-3) que o crescimento celular foi apenas um pouco superior aos anteriores. A concentração máxima de células viáveis foi de $5,5 \times 10^6$ células/mL e a cultura apresentou uma fase de adaptação de cerca de 15 horas. A velocidade específica de crescimento foi de $0,024 \text{ h}^{-1}$ e a viabilidade celular manteve-se acima de 90% durante todo o cultivo. O pH do cultivo apresentou valor inicial de 6,28, aumentou para 6,33 no início do cultivo, voltando a cair e atingindo 6,20 no final. A concentração máxima de células no ensaio paralelo realizado em frasco *schott* (ensaio SC-3) foi de $7,8 \times 10^6$ células viáveis/mL e a velocidade específica de crescimento foi de $0,033 \text{ h}^{-1}$. O aumento da taxa de agitação durante o cultivo deveu-se à formação de *pellets* no fundo do biorreator devido às baixas taxas de agitação. Como visto, os valores obtidos com a cultura em menor escala, na qual o mesmo inóculo foi utilizado, foram novamente superiores àqueles obtidos no ensaio em biorreator, apesar do ensaio em frasco *schott* ter apresentado resultados aquém daqueles comumente encontrados.

O consumo de glicose foi bastante similar nos três ensaios em biorreator, sendo mais consumida no ensaio RE-2, no qual atingiu um nível de 3,7 g/L. O coeficiente de rendimento de células a partir de glicose foi maior nos dois primeiros ensaios ($1,21 \times 10^6$ células/g de glicose e $1,40 \times 10^6$ células/g de glicose nos ensaios RE-1 e RE-2, respectivamente), diminuindo com as modificações realizadas para redução do estresse no ensaio RE-3 ($0,64 \times 10^6$ células/g de glicose). Esses números mostram que, quando submetidas a um maior estresse, as células parecem utilizar a glicose com maior eficiência, já que com um grama deste nutriente foi possível obter aproximadamente o dobro do número de células nos dois primeiros ensaios. Lactato foi produzido nos dois primeiros ensaios em pequena quantidade, 0,31 g/L no ensaio RE-1 e 0,13 g/L no ensaio RE-2, não sendo formado durante o ensaio RE-3. Já o amônio foi produzido em grande quantidade em todos os ensaios, atingindo cerca de 81 mg/L (4,5 mM) nos ensaios RE-1 e RE-2 e 67 mg/L (3,7 mM) no ensaio RE-3. Segundo Ikonomou e colaboradores (2003), as células de inseto não são tão sensíveis à presença de amônio quanto às células de mamíferos, já que a adição de 10 mM de sais de amônio não afetou o crescimento das linhagens Sf9 e BTI-EAA. A presença de 30 mM de NH_4Cl influenciou discretamente o crescimento das células High Five, mas teve grande impacto na produção de proteína recombinante. Estudos mostram também que alanina é geralmente formada quando há excesso de glicose no meio de cultura, assim como amônio é formado quando há limitação do crescimento por este

nutriente (Ikonomou *et al.*, 2003), o que não foi verificado neste trabalho, já que amônio foi produzido durante todo o cultivo na presença de altas concentrações de glicose.

Durante a realização destes ensaios em biorreator, foram retiradas amostras para avaliar a expressão da glicoproteína do vírus da raiva pelas células S2AcGPV2. As Figuras 5.30 a 5.32 mostram os resultados obtidos.

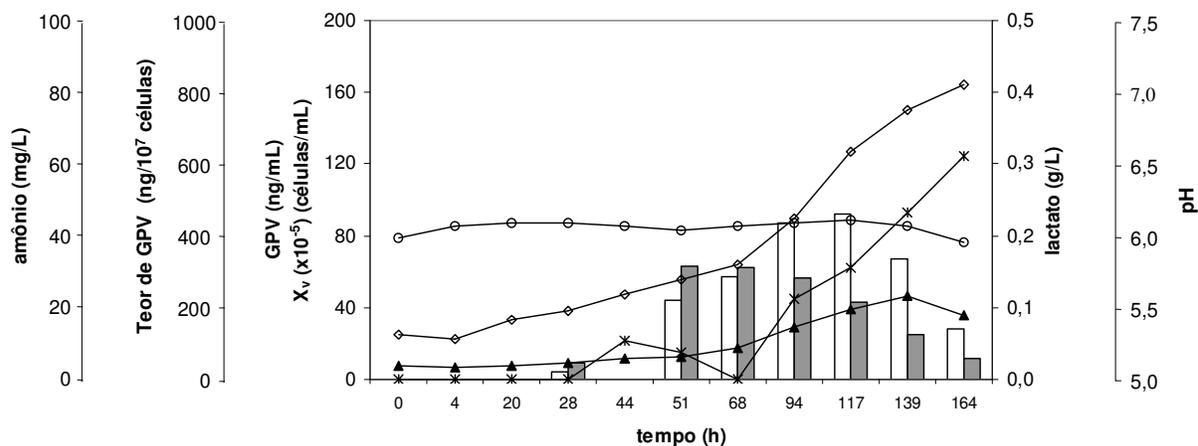


Figura 5.30. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-1.

Na Figura 5.30, pode-se observar que a concentração de GPV aumentou durante a fase de crescimento exponencial, atingindo cerca de 93 ng/mL em 117 horas de ensaio. Após a cultura atingir sua máxima concentração celular, a concentração de GPV decresceu. O teor de GPV apresentou inicialmente uma elevação, atingindo o valor de 317 ng/10⁷ células em 51 horas, manteve-se neste patamar até 68 horas e decaiu após este período. Como mencionado anteriormente, a glicoproteína do vírus da raiva sofre modificações conformacionais em pH ácido, perdendo sua forma nativa. No ensaio RE-1, observa-se que a diminuição da concentração de GPV ocorreu após a concentração de lactato atingir cerca de 0,2 g/L. Entretanto, o acúmulo deste metabólito não modificou o pH do meio de cultura, que, apesar de ácido, não sofreu grandes variações durante o cultivo. Em relação à

influência da concentração de amônio, nota-se que a queda na concentração de glicoproteína ocorreu quando a concentração deste metabólito era superior a 63 mg/L.

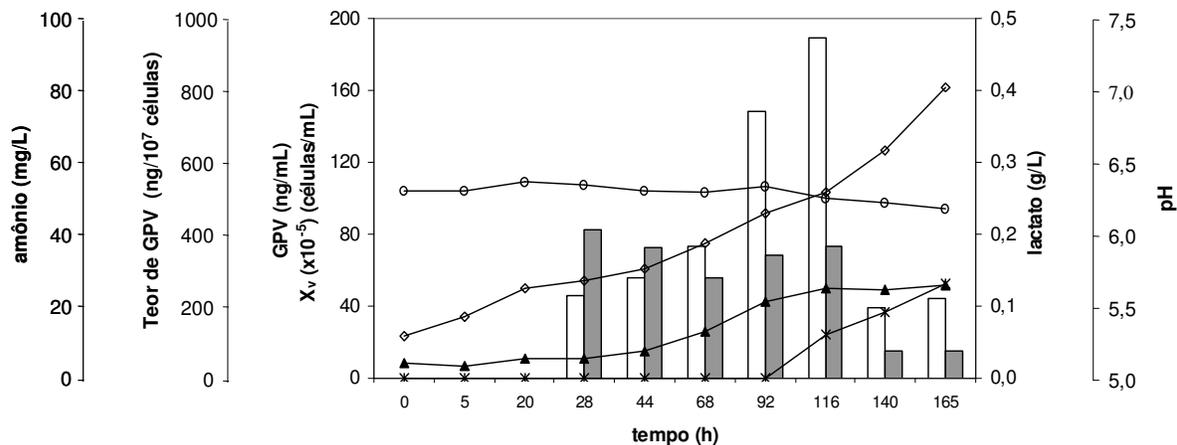


Figura 5.31. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-2.

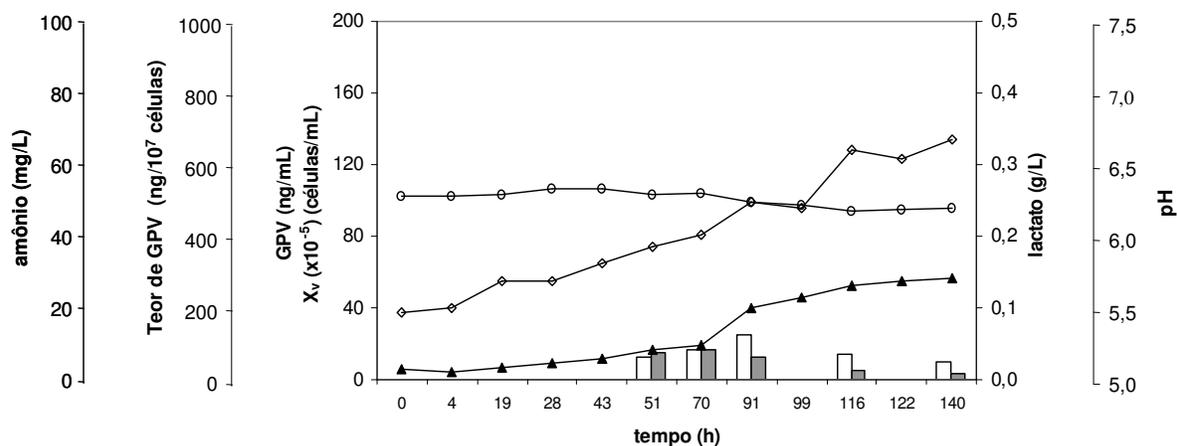


Figura 5.32. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-3.

Como no ensaio anterior, no segundo experimento realizado em biorreator (Figura 5.31), verificou-se que a concentração de GPV aumentou até 116 horas, período no qual a concentração celular era máxima, atingindo 189 ng/mL, e depois diminuiu para cerca de 40 ng/mL. O teor de GPV, que no início do cultivo era cerca de 412 ng/10⁷ células, apresentou uma variação em torno de 300 ng/10⁷ células, decaindo após 116 horas de cultivo. Observa-se que a queda na concentração de GPV ocorreu após a concentração de lactato atingir 0,1 g/L e a concentração de amônio atingir 52 mg/L. O pH do meio de cultura não sofreu uma grande variação durante o cultivo.

Com as mudanças realizadas na operação do biorreator no terceiro ensaio realizado em maior escala, verificou-se que a concentração de proteína foi significativamente menor. Observou-se que a concentração de GPV aumentou com o crescimento celular, atingindo 25,3 ng/mL em 91 horas de cultivo. O teor de GPV também foi bastante baixo durante todo o ensaio. Apesar dos baixos valores de concentração de proteína, verifica-se que não houve influência do pH nestes resultados, já que os valores mantiveram-se praticamente constantes durante o ensaio, o mesmo sendo observado com relação à concentração de lactato, já que não houve produção deste metabólito. Já em relação à concentração de amônio, verificou-se que a diminuição da concentração de GPV ocorreu quando a concentração deste metabólito atingiu cerca de 50 mg/L.

De maneira geral, os dados obtidos mostram que a concentração de GPV aumenta com o crescimento celular; entretanto, o teor de GPV não apresenta o mesmo comportamento, mantendo-se relativamente constante por um certo período e decaindo posteriormente. Além disso, verificou-se que a queda na concentração de GPV pode estar relacionada à produção de amônio, já que a queda na concentração da glicoproteína ocorreu quando os níveis de este metabólito atingiram a faixa de 50 a 60 mg/L. O fato do meio de cultura apresentar pH ácido também pode estar interferindo na dosagem de GPV. Entretanto, em uma tentativa de cultivo destas células em pH 6,8, neste meio de cultura, as células não foram capazes de se desenvolver satisfatoriamente.

Apesar das diferenças em relação aos protocolos de lise celular empregados, uma comparação entre os resultados obtidos em biorreator e aquele verificado em frasco *schott* mostra que a produção da glicoproteína foi maior nos ensaios realizados em maior escala. Além disso, os valores obtidos com esta formulação de meio de cultura, tanto em reator

quanto em frasco *schott*, foram superiores àqueles obtidos para os meios suplementados com reduzido percentual de soro fetal bovino e àqueles obtidos para os meios TC100 suplementado com 10% de SFB e SF900 II (apresentados anteriormente na Tabela 5.8), considerando-se ainda que naquele caso utilizou-se um anticorpo policlonal para detecção da glicoproteína, anticorpo este que detecta não apenas a proteína em conformação trimérica, mas também fragmentos desta. Nestas últimas análises, um anticorpo monoclonal específico para a forma trimérica foi empregado.

5.16. Avaliação do Efeito de Diferentes Concentrações de Pluronic F68 (Ensaio CIN-7)

Nos ensaios em biorreator, foram realizadas algumas tentativas para reduzir o estresse causado às células e verificar se este era o motivo do menor crescimento em maior escala. As modificações realizadas no sistema de cultivo não foram bem sucedidas e avaliou-se a hipótese de aumentar a concentração do protetor contra cisalhamento Pluronic F68. Para isso, realizou-se, primeiramente, um ensaio em frascos *schott* com diferentes concentrações de Pluronic F68 para avaliar qual a maior concentração deste suplemento que poderia ser utilizado no cultivo das células S2AcGPV2 sem causar efeito tóxico a elas (ensaio CIN-7). Na literatura, encontra-se que a faixa de concentração de Pluronic F68 recomendada para o cultivo de células animais é de 0,05 a 0,3% (m/v) (Marks, 2003). Neste ensaio, testou-se uma faixa de 0,1 a 0,6% (m/v). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.33.

Verifica-se que não houve grandes diferenças entre os cultivos. A concentração celular máxima variou de $8,4 \times 10^6$ a $11,0 \times 10^6$ células/mL, sendo que os maiores valores foram obtidos para as concentrações de 0,1 e 0,2% de Pluronic F68. As velocidades específicas de crescimento também foram bastante próximas, variando de $0,033 \text{ h}^{-1}$ (0,6% de Pluronic F68) a $0,039 \text{ h}^{-1}$ (0,3% de Pluronic F68). Entretanto, observou-se, com uma suplementação deste composto acima de 0,4%, a formação de um grande número de agregados de células, o que pode interferir no transporte de nutrientes, na eliminação de metabólitos e na expressão do produto.

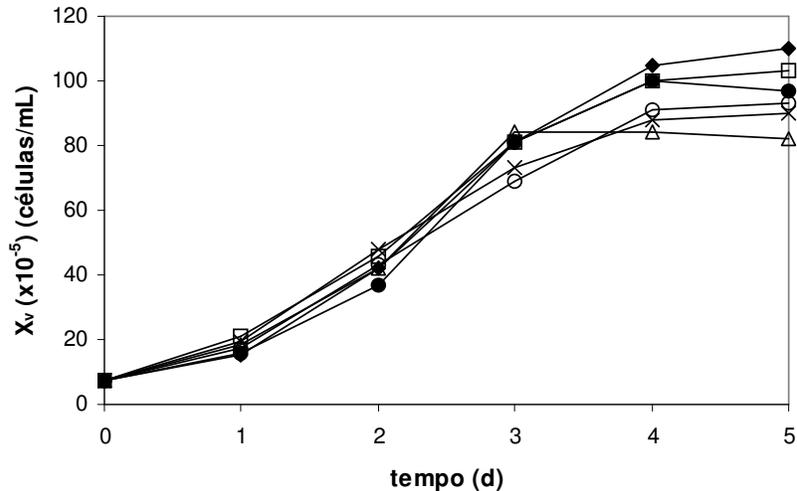


Figura 5.33. Avaliação de diferentes concentrações de Pluronic F68 no crescimento das células S2AcGPV2 (ensaio CIN-7). (◆) 0,1%, (□)0,2%, (×)0,3%, (△)0,4%, (○)0,5% e (●)0,6%.

5.17. Ensaios em Biorreator com Aumento da Concentração de Pluronic F68 (Ensaios RE-4 e RE-5)

Com a avaliação do efeito das diferentes concentrações de Pluronic F68, realizaram-se novos ensaios em biorreator para avaliar se o menor crescimento celular estava mesmo relacionado à maior tensão de cisalhamento que ocorre neste sistema de cultivo. Os resultados estão apresentados na Figura 5.34.

Inicialmente, a concentração de 0,3% (m/v) de Pluronic F68 foi adotada (ensaio RE-4), já que, com concentrações superiores a esta, houve uma tendência de formação de agregados de células. Na Figura 5.34 observa-se que, com o aumento da concentração do Pluronic F68, o crescimento celular no biorreator foi bastante similar ao obtido no frasco *schott* (ensaio SC-4), mostrando que o baixo crescimento verificado nos ensaios anteriores estava potencialmente relacionado ao estresse devido ao cisalhamento. Não houve fase lag em ambas as culturas, as concentrações máximas atingidas foram de $9,0 \times 10^6$ células/mL e $9,8 \times 10^6$ células/mL e as velocidades específicas de crescimento máximas de $0,033 \text{ h}^{-1}$ e $0,035 \text{ h}^{-1}$ para o reator e o frasco *schott*, respectivamente. A viabilidade manteve-se acima de 90% em ambos os cultivos. O pH do cultivo apresentou valor inicial de 6,28, caindo

para 6,20 durante o cultivo e voltando a 6,29 no final deste. No ensaio em reator, a glicose presente no meio de cultura não foi totalmente consumida, e o coeficiente de rendimento de células a partir de glicose foi similar ao obtido no ensaio RE-3 ($0,63 \times 10^6$ células/g de glicose). Lactato começou a ser produzido após 43 horas de cultivo e atingiu cerca de 0,3 g/L no final da cultura. Amônio também foi bastante produzido, como nos ensaios anteriores em biorreator, e atingiu 89 mg/L (4,9 mM).

Para verificar se o crescimento celular em biorreator poderia superar o crescimento em frasco *schott*, realizou-se um ensaio com 0,6% (m/v) de Pluronic F68 (ensaio RE-5). Como pode ser observado na Figura 5.34, a concentração máxima de células atingida (cerca de $16,1 \times 10^6$ células/mL) foi bastante superior às observadas nos ensaios anteriores, sendo superior também ao ensaio controle realizado em frasco *schott* com o mesmo inóculo (ensaio SC-5), que atingiu o valor de $8,2 \times 10^6$ células/mL. Como o inóculo e o meio de cultura empregados nos ensaios foram os mesmos, o menor crescimento celular observado no frasco agitado pode ser atribuído à limitação por oxigênio, já que neste sistema havia troca de ar apenas quando o frasco era aberto, ao contrário do biorreator, onde a concentração de oxigênio era controlada. No frasco, ao se atingir uma dada concentração celular, a transferência de oxigênio ocasionada pela abertura do frasco passou a não ser mais suficiente. Apesar do maior crescimento, o ensaio em reator apresentou maior fase lag (cerca de 30 horas) em comparação ao ensaio em frasco *schott* (menor que 19 horas). A velocidade específica de crescimento máxima das células cultivadas em biorreator, cerca de $0,027 \text{ h}^{-1}$, foi inferior à verificada para as células cultivadas em menor escala ($0,033 \text{ h}^{-1}$). As viabilidades mantiveram-se bastante altas em ambos os cultivos. O pH, inicialmente em 6,18, caiu ligeiramente no início do cultivo e manteve-se em torno de 6,10 durante o ensaio. A glicose manteve-se constante inicialmente e, posteriormente, foi totalmente consumida pelas células até o término do cultivo. Este nutriente não foi o substrato limitante, já que a concentração de glicose ainda era bastante elevada na saída das células da fase de crescimento exponencial, e a interrupção do crescimento pode estar relacionada com a escassez de algum outro nutriente, como um ou mais aminoácidos. O coeficiente de rendimento de células a partir de glicose foi de $0,64 \times 10^6$ células/g de glicose, mesmo valor dos ensaios RE-3 e RE-4. Lactato passou a ser formado quando as células entraram na fase estacionária de crescimento, atingindo cerca de 0,3 g/L. Como nos ensaios anteriores, o

amônio também foi bastante produzido, atingindo cerca de 86,3 mg/L (4,8 mM) em 211 horas de cultivo.

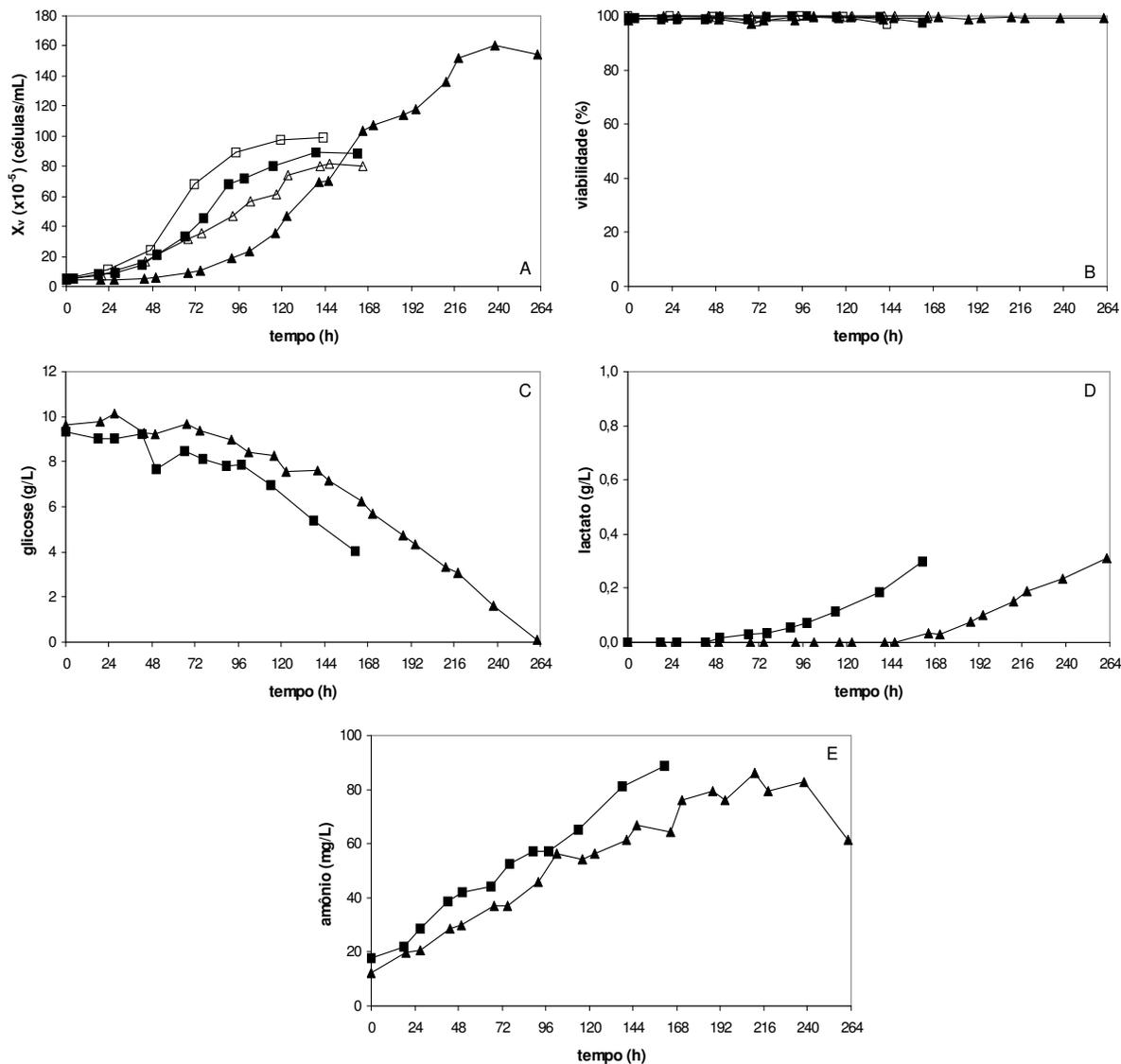


Figura 5.34. Concentração de células viáveis (A), viabilidade celular (B) e concentrações de glicose (C), lactato (D) e amônio (E) obtidas para os ensaios RE-4 (■) e RE-5 (▲) em biorreator e para os ensaios em paralelo de acompanhamento em frascos *schott* SC-4 (□) e SC-5 (△).

Os resultados de dosagem da glicoproteína GPV no lisado celular no ensaio RE-4 (Figura 5.35) mostram que a concentração aumentou até atingir cerca de 106 ng/mL em 66 horas de cultivo, período em que a cultura estava em fase exponencial de crescimento, diminuindo para 89 ng/mL em 90 horas. Em relação ao teor de GPV, houve um aumento até cerca de 50 horas (427 ng/10⁷ células) e um decréscimo a partir deste ponto. O pH do cultivo não sofreu alteração apreciável, com a concentração de lactato atingindo cerca de 0,04 g/L. Entretanto, houve uma pequena queda da concentração de GPV quando a concentração de amônio era de 44 mg/L.

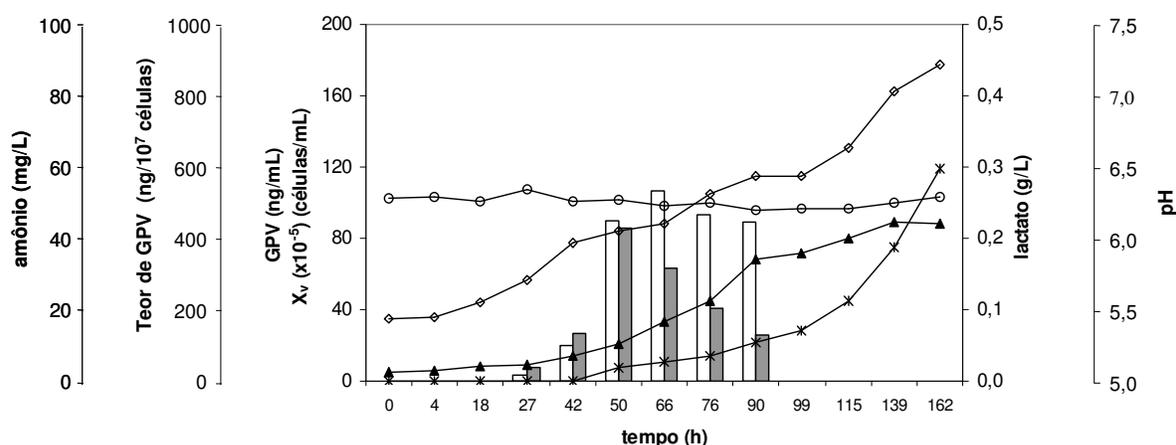


Figura 5.35. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-4.

Já no ensaio RE-5 (Figura 5.36), a concentração de glicoproteína aumentou até 123 horas de cultivo, atingindo cerca de 146 ng/mL, diminuindo após este período. O teor de GPV, inicialmente alto (563 ng/10⁷ células), decaiu e manteve-se em torno de 400 ng/10⁷ células, voltando a cair após 116 horas de cultivo. O pH do ensaio e a produção de ácido láctico também não apresentaram influência sobre a quantificação da glicoproteína, já que o pH manteve-se constante e a produção do metabólito teve início após a queda na concentração de GPV. Entretanto, a diminuição da concentração da glicoproteína ocorreu após a concentração de amônio atingir 57 mg/L.

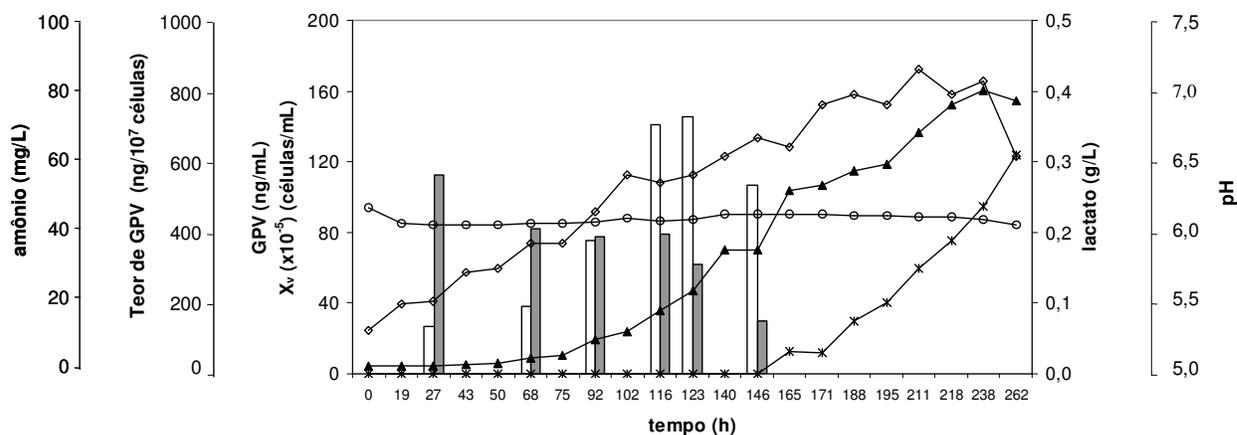


Figura 5.36. Concentração (□) e teor (■) de GPV obtidos no lisado celular, e concentração de células viáveis (▲), concentração de lactato (*), concentração de amônio (◇) e pH (○) para o ensaio RE-5.

Os resultados obtidos indicam que, com a adição de uma maior concentração do protetor de cisalhamento Pluronic F68, foi possível a obtenção de uma alta concentração de células em cultivo em biorreator, mostrando que a linhagem empregada é bastante sensível ao estresse por cisalhamento. A produção da glicoproteína de interesse também foi superior nos ensaios em reator e, além disso, verificou-se que a produção de GPV parece estar associada ao crescimento celular e que a queda na concentração desta pode estar associada ao aumento da concentração de amônio, conforme relatado por Ikonou e colaboradores (2003). Entretanto, a influência do pH e da produção de lactato sobre a quantificação da glicoproteína ainda necessita de melhor averiguação em um trabalho futuro.

Ressalta-se que uma nova população de células já foi selecionada no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, com cerca de 58% de células expressando a glicoproteína e atingindo cerca de 2760 ng/10⁷ células, o que certamente contribuirá com futuros estudos sobre o cultivo destas células e a análise de seu potencial para a produção de biofármacos.

5.18. Análise Preliminar da Viabilidade Econômica da Produção da Glicoproteína da Raiva pelas Células S2AcGPV2 em Meio TC100 Suplementado com *Yeastolate*, Emulsão Lipídica, Glicose, Glutamina e Pluronic F68

A avaliação econômica preliminar de um projeto para a produção de um biofármaco geralmente envolve a estimativa do capital de investimento e dos custos de operação e uma análise de rentabilidade, além do custo médio de desenvolvimento de novas drogas, que está na faixa de US\$200 a 500 milhões (Petrides, 2000).

Na avaliação de viabilidade econômica da produção da glicoproteína do vírus da raiva pelas células S2AcGPV2 em meio TC100 suplementado com *yeastolate*, emulsão lipídica, glicose, glutamina e Pluronic F68 para a produção de vacina anti-rábica aqui apresentada, o investimento total foi calculado por intermédio de índices baseados nos preços dos principais equipamentos a serem utilizados. Apesar do desvio ainda apresentar um valor alto nesta etapa (cerca de 40%), estes cálculos permitem obter uma primeira estimativa do retorno do investimento e a verificação dos principais componentes do custo (Barbosa Júnior, 2003; Justo, 2003).

O mercado de vacina anti-rábica no Brasil inclui vacinas para uso humano e animal (cães, gatos e herbívoros). A vacina geralmente administrada em humanos, cães e gatos é a Fuenzalida & Palácios modificada, preparada com vírus inativados a partir de cérebro de camundongos infectados. Para uso humano, esta vacina vem sendo gradativamente substituída por outras produzidas através de cultivos celulares. O número nacional de doses desta vacina aplicadas em humanos no ano de 2002 foi de cerca de 1,5 milhões (Fundação Nacional de Saúde, 2002), e, em cães e gatos, este número foi de 24 milhões em 2003 (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2004). Já no caso dos herbívoros, as vacinas administradas são todas obtidas a partir de cultivos celulares e, no ano de 2005, o número de doses vendidas foi de cerca de 108 milhões (Sindicado Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal, 2007). Para a realização deste estudo, o foco foi o mercado veterinário, e, devido à baixa produção da proteína pelas células S2AcGPV2, foi calculada a concentração de GPV que deveria ser produzida por estas células para que a competição por 10% do mercado nacional de vacinas para herbívoros (10,8 milhões de doses) fosse viável.

A Figura 5.37 mostra um fluxograma simplificado da etapa de cultivo celular para a produção da glicoproteína do vírus da raiva pelas células S2AcGPV2.

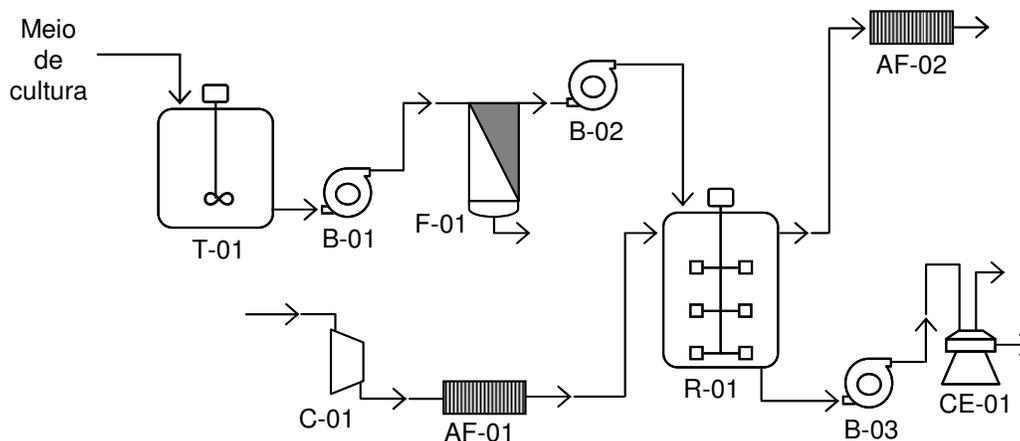


Figura 5.37. Fluxograma simplificado da etapa de cultivo celular para a produção da glicoproteína do vírus da raiva pelas células S2AcGPV2.

O meio de cultura e os demais compostos são enviados para um tanque de aço inoxidável (T-01) e a solução é esterilizada usando um filtro tipo *dead-end* (F-01). O biorreator (R-01) opera em modo batelada, com um ciclo de vida de 144 horas (24 horas para o preparo do reator e 120 horas para fermentação), volume total de 700 litros e volume de trabalho de 500 litros. A biomassa gerada é separada do sobrenadante por centrifugação (CE-01) e segue para as etapas de recuperação e purificação da glicoproteína. Considerando-se que o tempo operacional da planta seja de 330 dias/ano, seriam gastos anualmente cerca de 27.500 litros de meio de cultura.

O custo de cada equipamento utilizado em uma planta química é dependente de vários fatores, como tamanho, material, instrumentação e outras condições de mercado. Se o preço de aquisição de um equipamento de capacidade u no ano r é $C_{p,u,r}$, o custo estimado do mesmo equipamento com capacidade v no ano s é dado pela Equação 5.1:

$$C_{p,v,s} = C_{p,v,r} \cdot \left(\frac{I_s}{I_r} \right) = C_{p,u,r} \cdot \left(\frac{v}{u} \right)^a \cdot \left(\frac{I_s}{I_r} \right) \quad (5.1)$$

onde I_i é o índice de custo no ano s ou r .

As estimativas de custo de capital pré-projeto geralmente são obtidas de preços antigos sendo, portanto, necessária a correção por inflação (ou deflação, mais raramente) através de índices. Os índices comumente empregados por engenheiros na indústria química são o *Engineering News-Record Constructions Index* (ENR), o *Nelson-Farrar Refinery Construction Index* (Índice Nelson), o *Marshall and Swift Process Industry Index* (M&S) e o *Chemical Engineering Plant Cost Index* (CEPCI), sendo este último o mais comumente utilizado na indústria química e publicado regularmente na *Chemical Engineering*.

Os custos dos equipamentos utilizados foram obtidos através do programa computacional SuperPro Designer (Intelligen, 2007) e, como todos os valores são bastante recentes (ano 2006), eliminou-se o fator relativo à inflação da Equação 5.2, e uma estimativa adequada foi obtida através da seguinte equação:

$$C_{p,v,s} = C_{p,u,r} \cdot \left(\frac{v}{u} \right)^a \quad (5.2)$$

sendo que o valor do expoente (a) varia entre 0,5 e 1, com um valor médio de 0,6 (Petrides, 2000). A Tabela 5.12 mostra a estimativa de custo de cada um dos equipamentos apresentados na Figura 5.37. Já a estimativa do investimento total da planta foi calculada com base no custo total destes equipamentos, utilizando-se os valores médios dos multiplicadores, e está apresentada na Tabela 5.13. Esta estimativa inclui as principais despesas relativas à construção e instalação dos equipamentos e ao início da operação da planta.

Tabela 5.12. Estimativa de custo dos equipamentos empregados na etapa de cultivo celular para a produção da glicoproteína do vírus da raiva.

Equipamento	Quantidade	Custo unitário (US\$)	Custo total (US\$)
Tanque agitado (T-01) de 1250 L	1	133.286,71	133.286,71
Filtro tipo dead-end (F-01)	1	20.528,91	20.528,91
Fermentador (R-01) de 1250 L	1	301.588,06	301.588,06
Compressor de ar (C-01)	1	39.922,00	39.922,00
Filtro de ar (AF-01 e AF-02)	2	5.357,00	10.714,00
Centrífuga (CE-01)	1	43.710,85	43.710,85
Bombas (B-01 a B-03)	3	4.091,00	12.273,00
Custo total de compra de equipamentos (CC)			562.023,53

Já o custo de operação da planta é a soma de todas as despesas relativas à matéria-prima, mão-de-obra, utilidades, tratamento de efluentes, etc. Nesta avaliação, considerou-se que a indústria em questão tem uma certa infra-estrutura no ramo biotecnológico, como laboratórios equipados para a preparação do inóculo, equipamentos para o acompanhamento do processo e áreas específicas destinadas à manipulação de células animais. Além disso, admitiu-se que esta indústria possua capacidade ociosa em sua área de utilidades, suficiente para fornecer vapor, água e ar comprimido necessários para a operação da nova unidade e para tratamento de efluentes (Barbosa Júnior, 2003). A Tabela 5.14 apresenta o custo total com matéria-prima. Os valores foram baseados nos catálogos dos fabricantes, e considerou-se um ganho de escala de 70%, já que os preços dos fabricantes são dados em função de um volume de 1 litro.

Tabela 5.13. Índices médios de composição do investimento total a partir do custo dos equipamentos (Petrides, 2000).

Item de custo	Média do multiplicador	Investimento (US\$)
<i>1. Custo direto da planta (CD)</i>		
Instalação	0,50 x CC	281.011,77
Tubulação	0,40 x CC	224.809,41
Instrumentação	0,35 x CC	196.708,24
Isolamento	0,03 x CC	16.860,71
Instalação elétrica	0,15 x CC	84.303,53
Subtotal		803.693,65
<i>2. Custo total indireto da planta (CI)</i>		
Engenharia	0,25 x CC	140.505,88
Construção	0,35 x CC	196.708,24
Subtotal		337.214,12
<i>3. Custo total da planta (CTP = CD + CI)</i>		1.140.907,77
Honorários do empreiteiro (HE)	0,05 x CC	28.101,18
Contingência (C)	0,10 x CC	56.202,35
<i>4. Capital fixo direto (CFD = CTP + HE + CI)</i>		1.225.211,30
Capital de giro (C_{giro})	0,10 x CC	56.202,35
Custo de partida ($C_{partida}$)	0,05 x CC	28.101,18
<i>5. Capital de investimento (CTI = CFD + C_{giro} + $C_{partida}$)</i>		1.309.514,83

Com o cálculo do custo com matéria-prima, pode-se então estimar o custo total de produção, já que, em uma indústria de processos biotecnológicos, despesas com matéria-prima representam 10 a 80% deste custo. Assumindo-se que o meio de cultura representa o maior valor dentre os custos operacionais, considerou-se o percentual máximo de 80%,

atingindo um custo total de produção de cerca de US\$852.590,89. Como mencionado anteriormente, esta estimativa refere-se somente à etapa de cultivo celular. Despesas relativas a materiais utilizados nos processos de recuperação e purificação, que também apresentam custos bastante elevados, não foram computadas. Considerou-se que 20% da GPV é perdida nos processos de recuperação e purificação.

Tabela 5.14. Estimativa do custo de matéria-prima.

Composto	Quantidade	Custo unitário	Custo total (US\$/ano)
Meio TC100	26.812,50 L/ano	21,43 US\$/L	574.591,88
<i>Yeastolate</i>	412,50 L/ano	72,75 US\$/L	30.009,38
Emulsão lipídica	275,00 L/ano	106,50 US\$/L	29.287,50
Pluronic F68	82,50 Kg/ano	81,47 US\$/Kg	6.721,28
Glicose	244,75 Kg/ano	17,52 US\$/Kg	4.288,02
Glutamina	79,75 Kg/ano	466,14 US\$/Kg	37.174,67
Custo total			682.072,71

Como ainda não foram realizados testes imunogênicos com a glicoproteína do vírus da raiva produzida pelas células S2AcGPV2, utilizou-se como referência uma proteína produzida também por células de inseto para a obtenção de uma vacina contra o vírus da Língua Azul, doença que acomete bovinos e ovinos. Testes realizados com esta proteína mostraram que uma concentração de 100 µg/dose foi necessária para conferir imunidade (Roy *et al.*, 1990), e esta foi então a concentração de proteína utilizada nesta análise de viabilidade. Considerando que 10% do mercado nacional de herbívoros corresponde a 10,8 milhões de doses, a produção anual de GPV deveria ser de 1,08 Kg.

Como preço de venda, considerou-se o mesmo valor da dose de vacinas contra a raiva de herbívoros comercializadas atualmente, também obtidas a partir do cultivo de células animais, que está em torno de US\$0,20 a dose. Como esta análise foi realizada apenas para a etapa de cultivo celular, considerou-se o custo de cultivo das células para a

obtenção da glicoproteína como 50% deste valor, ou seja, US\$0,10 a dose. Assumindo que os impostos incidentes sobre o lucro bruto sejam de 40%, pode-se estimar que o lucro líquido é de cerca de US\$136.445,47. Considerando-se uma taxa de juros de 5% a.a., tem-se que o tempo de recuperação do investimento é de cerca de 13,4 anos, valor um pouco elevado. Se cada dose fosse comercializada a US\$0,13, o que não seria inviável, já que há uma inovação tecnológica no processo proposto, o tempo de retorno do investimento cairia para 4 anos. A Tabela 5.15 mostra um resumo das análises econômicas efetuadas.

Tabela 5.15. Análise econômica global para a produção de GPV a partir das células S2AcGPV2.

Item	Valor (base: US\$0,10/dose)	Valor (base: US\$0,13/dose)
Capital total de investimento (US\$)	1.309.514,83	1.309.514,83
Custo total de produção (US\$/ano)	852.590,89	852.590,89
Capacidade da planta (g/ano)	1.080	1.080
Custo de produção por unidade (US\$/g)	789,44	789,44
Preço de venda (US\$/g)	1.000,00	1.300,00
Rendimentos (US\$/ano)	1.080.000,00	1.404.000,00
Lucro bruto (US\$/ano)	227.409,11	551.409,11
Impostos (US\$/ano)	90.963,65	220.563,65
Lucro líquido (US\$/ano)	136.445,47	330.845,47
Tempo de recuperação do investimento (5% a.a.)	13,4	4,0

Entretanto, para que isso ocorresse, as células deveriam produzir cerca de 50 µg/mL da glicoproteína, valor bem acima do máximo obtido neste trabalho, que foi de 0,189 µg/mL no ensaio RE-2, realizado em biorreator.

Para o aumento da produção de GPV pelas células para cerca de 50 µg/mL, uma alternativa seria a seleção, dentre esta população mista de células, de uma subpopulação

com maior produtividade de glicoproteína, ou mesmo a realização de novas transfecções, e/ou o emprego de um sistema em perfusão, resultando em maiores densidades celulares. A redução dos custos operacionais, com a utilização de reatores mais baratos como o reator de ondas, por exemplo, também poderia ser considerada.

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho, com a finalidade de estudar a influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento e a viabilidade das células *Drosophila melanogaster* Schneider 2 transfectadas para a expressão da glicoproteína do vírus da raiva (S2AcGPV2), levaram às seguintes conclusões:

- 1) Em cultivos realizados no meio livre de soro SF900 II, verificou-se que o comportamento da linhagem transfectada apresentou diferenças em relação ao da linhagem selvagem e que os nutrientes glicose e glutamina podem ser limitantes em meios de cultura mais pobres, já que foram bastante consumidos nestes ensaios.
- 2) Nos cultivos em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino, a glicose foi o nutriente limitante do crescimento celular, já que sua ausência ocasionou a interrupção do crescimento celular.
- 3) A lactoalbumina hidrolisada e o concentrado protéico de soro de leite não foram suplementos adequados para o cultivo das células S2AcGPV2, sendo que a adição deste último causou alterações morfológicas nas células, com o aparecimento de muita granulação, e altas taxas de morte celular. Concentrações de emulsão lipídica acima de 1% (v/v) também suprimiram o crescimento celular ou levaram as células à morte.
- 4) O emprego de *yeastolate* mostrou-se mais efetivo que a adição de Hy Soy no crescimento das células S2AcGPV2 em meio livre de soro, e a formulação contendo 3 g/L de *yeastolate*, 10 g/L de glicose, 3,5 g/L de glutamina, 1% de emulsão lipídica e 0,1% de Pluronic F68, utilizando como meio basal o meio TC100, foi selecionada como a mais adequada dentre as avaliadas.

5) Os principais responsáveis pelo aumento da osmolalidade nos meios de cultura foram os suplementos *yeastolate* e emulsão lipídica.

6) Inicialmente, os estudos em biorreator não reproduziram os resultados comumente obtidos em frascos *schott* mantidos em incubadora rotativa, apresentando menores valores de crescimento celular (até 53%) e velocidade específica de crescimento (até 58%). Porém, com o aumento da concentração de Pluronic F68, o crescimento das células no biorreator apresentou-se superior ao do frasco *schott*, indicando que esta linhagem é bastante sensível ao estresse por cisalhamento.

7) A dosagem da glicoproteína do vírus da raiva mostrou que as diferentes adaptações sofridas pelas células S2AcGPV2 não alteraram sua capacidade de expressão e que a proteína foi produzida na sua forma trimérica, como observado também no ensaio de imunofluorescência.

8) A análise de viabilidade econômica mostrou que este processo pode ser viável caso haja uma maior expressão por célula e um maior crescimento celular.

7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Para dar continuidade ao trabalho desenvolvido, sugere-se o estudo dos aspectos citados a seguir:

- Isolamento de subpopulações de células que apresentem alta produtividade de GPV;
- Estudo da osmolalidade para verificar qual o valor limite aceitável para o cultivo das células S2AcGPV2 e se os efeitos inibitórios estão relacionados ao aumento dos valores de osmolalidade ou à composição dos diferentes suplementos;
- Estudos de metabolismo celular através da adição de diferentes concentrações de nutrientes, avaliando-se qual o substrato limitante e o comportamento das células com relação ao acúmulo de metabólitos como lactato e amônio, visando o estabelecimento de modelos matemáticos que descrevam o desempenho celular;
- Avaliação dos possíveis fatores que afetam a produção e a detecção da glicoproteína do vírus da raiva, como estresse por cisalhamento, pH ácido e concentração de amônio;
- Realização de modificações no sistema de cultivo e no meio de cultura visando um aumento do crescimento celular e, conseqüentemente, da expressão da proteína de interesse.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATHOS, S.N. Production Scale Insect Cell Culture. *Biotechnology Advances*, 1991, vol. 9, p. 51-68.
- AMIOT, J.; GERMAIN, L.; TURGEON, S.; LEMAY, M.; ORY-SALAM, C. e AUGER, F. A. Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *International Dairy Journal*, 2004, vol. 14, p. 619-626.
- AUGUSTO, E.F.P. e OLIVEIRA, M.S. Processos com Células Animais. In: *Biotecnologia Industrial*, volume 3, Editora Edgard Blücher, 1ª edição, pp. 593, p. 547-582, 2001.
- BACHMANN, A.S.; CORPUZ, G.; HARELD, W.P.; WANG, G. e COLLER, B.A. A simple method for the rapid purification of copia virus-like particles from *Drosophila* Schneider 2 cells. *Journal of Virological Methods*, 2004, vol. 115, p. 159-165.
- BALLEZ, J.S.; MOLS, J.; BURTEAU, C.; AGATHOS, S.N. e SCHNEIDER, Y.J. Plant protein hydrolysates support CHO-320 cells proliferation and recombinant IFN- γ production in suspension and inside microcarriers in protein-free media. *Cytotechnology*, 2004, vol. 44, p. 103-114.
- BANKS, D.J.; HUA, G. e ADANG, M. Cloning of a *Heliothis virescens* 110kda aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, vol. 33, p. 499-508.
- BARBOSA JÚNIOR, S. Desenvolvimento de processo de produção de anticorpos monoclonais utilizando técnicas de imobilização de células. São Paulo, 2003. Tese

(Doutor em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades USP/IPT/Instituto Butantan.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. e BRUNS, R.E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. 2ª edição, Editora da Unicamp, 1995.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. e BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2ª edição, Editora da Unicamp, 2003.

BATISTA, F.R.X.; PEREIRA, C.A.; MENDONÇA, R.Z. e MORAES, A.M. Avaliação de Suplementos na Formulação de Meios de Cultura para Células de Inseto Visando a Substituição do Soro Fetal Bovino (aceito para publicação nos Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, SINAFERM, Florianópolis, agosto de 2003).

BATISTA, F.R.X.; PEREIRA, C.A.; MENDONÇA, R.Z. e MORAES, A.M. Enhancement of Sf9 cells and baculovirus production employing Grace's medium supplemented with milk whey ultrafiltrate. *Cytotechnology*, 2005, vol. 49, p. 1-9.

BENTING, J.; LECAT, S.; ZACCHETTI, D. e SIMONS, K. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 278, p. 59-68.

BENYAJATI, C. e DRAY, J.F. Cloned *Drosophila* alcohol dehydrogenase genes are correctly expressed after transfection into *Drosophila* cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, vol. 81, p. 1701-1705.

BÉRDAD, C.; TOM, R. e KAMEM, A. Growth, nutrient consumption, and end product accumulation in Sf9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnology Progress*, 1993, vol. 9, p. 615-624.

BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B., e BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2001, vol. 4, p. 1-8.

BROOKS, M.A. e KURTTI, T.J. Insect cell and tissue culture. *Annual Review of Entomology*, 1971, vol. 16, p. 27-52.

Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Departamento de Saúde e Serviços Humanos, EUA. Disponível na Internet, http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the_virus/virus.htm, 2007.

CHA, H.J.; SHIN, H.S.; LIM, H.J.; CHO, H.S.; DALAL, N.N.; PHAM, M.Q. e BENTLEY, W.E. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, vol.24, p. 225-233.

CHAN, L.C.L.; YOUNG, P.R.; BLETCHLY, C. e REID, S. Production of the baculovirus-expressed dengue virus glycoprotein NS1 can be improved dramatically with optimized regimes for fed-batch cultures and the addition of the insect moulting hormone, 20-Hydroxyecdysone. *Journal of Virological Methods*, 2002, vol. 105, p. 87-98.

CHANG, K.H.; PARK, J.H.; LEE, Y.H.; KIM, J.H.; CHUN, H.O.; KIM, J.H. e CHUNG, I.S. Dimethylsulfoxide and sodium butyrate enhance the production of recombinant

- cyclooxygenase 2 in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biotechnology Letters*, 2002, vol. 24, p. 1353-1359.
- CHEN, Q.; BEHAR, K.L.; XU, T.; FAN, C. e HADDAD, G.G. Expression of *Drosophila* trealose-phosphate synthase in HEK-293 cells hypoxia tolerance. *The Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, vol. 278, p. 49113-49118.
- CHISTI, Y. Animal-Cell Damage in Sparged Bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 2000, vol. 18, p. 420-432.
- CULP, J.S.; JOHANSEN, H.; HELLMIG, B.; BECK, J.; MATTHEWS, T.J.; DELERS, A. e ROSENBERG, M. Regulated expression allows high-level production and secretion of hiv-1 gp120 envelope glycoprotein in *Drosophila* Schneider cells. *Bio-Technology*, 1991, vol. 9, p. 173-177.
- DA POIAN, A.T.; CARNEIRO, F.A. e STAUFFER, F. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of Rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, vol. 38, p. 813-823.
- DEML, L.; WOLF, H. e WAGNER, R. High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected *Drosophila* Schneider-2 cells. *Journal of Virological Methods*, 1999a, vol. 79, p. 191-203.
- DEML, L.; SCHIRMBECK, R.; REIMANN, J.; WOLF, H. e WAGNER, R. Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in *Drosophila* Schneider-2 cells. *Journal of Virological Methods*, 1999b, vol. 79, p. 205-217.

- DENAULT, J.B.; LAZURE, C.; DAY, R. e LEDUC, R. Comparative characterization of two forms of recombinant human SPC1 secreted from Schneider 2 cells. *Protein Expression and Purification*, 2000, vol. 19, p. 113-124.
- DEPARIS, V.; DURRIEU, C.; SCHWEIZER, M.; MARC, I.; GOERGEN, J.L.; CHEVALOT, I. e MARC, A. Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnology*, 2003, vol. 42, p. 75-85.
- DONALDSON, M.S. e SHULER, M.L. Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnology Progress*, 1998, vol. 14, p. 573-579.
- DOVERSKOG, M.; BERTRAM, E.; LJUNGGREN, J.; ÖHMAN, L.; SENNERSTAM, R. e HÄGGSTRÖM, L. Cell cycle progression in serum-free cultures of Sf9 insect cells: modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity. *Biotechnology Progress*, 2000, vol. 16, p. 837-846.
- DREWS, M.; PAALME, T. e VILU, R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*, 1995, vol. 40, p. 187-198.
- DREWS, M.; DOVERSKOG, M.; ÖHMAN, L.; CHAPMAN, B.E.; JACOBSSON, U.; KUCHEL, P.W. e HÄGGSTRÖM, L. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NMR. *Journal of Biotechnology*, 2000, vol. 78, p. 23-37.
- ECHALIER, G. *Drosophila cells in culture*, Academic Press, 1997.

FARREL, P. e IATROU, K. Transfected insect cells in suspension culture rapidly yield moderate quantities of recombinant proteins I protein-free culture medium. *Protein Expression and Purification*, 2004, vol. 36, p. 177-185.

FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique*, 3ª edição, Wiley-Liss, 1994.

FU, Z.F.; DIETZSCHOLD, B.; SCHUMACHER, C.L.; WUNNER, W.H.; ERTL, H.C.J. e KOPROWSKI, H. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, vol. 88, p. 2001-2005.

Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Avaliação do Programa Nacional de Controle da Raiva no Brasil. Disponível na Internet, <http://www.paho.org/cdmedia/hdmvp01/docs.rabia/paises/EVAL.RABIA.BRASIL.pdf>, 2002.

GAUDIN, Y. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *Journal of Virology*, 1997, vol. 71, n. 5, p. 3742-3750.

GAUDIN, Y., RUIGROK, R.W.H., KNOSSOW, M. e FLAMAND, A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *Journal of Virology*, 1993, vol. 67, n. 3, p. 1365-1372.

GIBSON, K.R.; VANEK, P.G.; KALOSS, W.D.; COLLIER, G.B.; CONNAUGHTON, J.F.; ANGELICHIO, M.; LIVI, G.P. e FLEMING, P.J. Expression of dopamine- β -hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells - Evidence for a mechanism of membrane-

binding other than uncleaved signal peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, p. 9490-9495.

HEIDEMANN, R.; ZHANG, C.; QI, H.; RULE, J.L.; ROZALES, C.; PARK, S.; CHUPPA, S.; RAY, M.; MICHAELS, J.; KONSTANTINOV, K. e NAVEH, D. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology*, 2000, vol. 32, p. 157-167.

HEWLETT, G. Strategies for optimizing serum-free media. *Cytotechnology*, 1991, vol. 5, p. 3-14.

HILL, R.M.; BRENNAN, S.O. e BIRCH, N.P. Expression, purification, and functional characterization of the serine protease inhibitor neuroserpin expressed in *Drosophila* S2 cells. *Protein Expression and Purification*, 2001, vol. 22, p. 406-413.

IKONOMOU, L.; BASTIN, G.; SCHNEIDER, Y.J. e AGATHOS, S.N. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2001, vol. 37, p. 549-559.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y.J. e AGATHOS, S.N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 62, p. 1-20.

Instituto Pasteur, Disponível na Internet, http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_publicacoes.htm, 2007.

Intelligen, Inc. SuperPro Designer Evaluation Version. Disponível na internet, <http://www.intelligen.com/demo.shtml>, 2007.

Invitrogen, Disponível na Internet, <https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewProductDetails&productDescription=111&catname=North%20America%20Main>, 2007.

JEON, H.K.; CHANG, K.H.; KIM, K.I. e CHUNG, I.K. Functional expression of recombinant tumstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biotechnology Letters*, 2003, vol. 25, p. 185-189.

JOANISSE, D.R.; INAGUMA, Y. e TANGUAY, R.M. Cloning and developmental expression of a nuclear ubiquitin-conjugating enzyme (DmUbc9) that interacts with small heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, vol. 244, p. 102-109.

JUSTO, O.R. Produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e avaliação do potencial de escalonamento do processo. Campinas, 2003. Tese (Doutor em Engenharia Química).

KHAZNADJI, E.; BOULARD, C. e MOIRE, N. Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells. *Experimental Parasitology*, 2003, vol. 104, p. 33-39.

KIRKPATRICK, R.B.; GANGULY, S.; ANGELICHIO, M.; GRIEGO, S.; SHATZMAN, A.; SILVERMAN, C. e ROSENBERG, M. Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270, no.34, p. 19800-19805.

- KLEDITZSCH, P.; PRATT, J.; VISHNUVARDHAN, D.; HENKLEIN, P.; SCHADE, R. e BEINFELD, M.C. Production, purification, and characterization of rat pro-CCK from serum-free adapted *Drosophila* cells. *Protein Expression and Purification*, 2003, vol. 31, p. 56-63.
- LEE, J.M.; PARK, J.H.; PARK, J.O.; CHANG, K.H. e CHUNG, I.S. Expression of recombinant erythropoietin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2000, vol. 36, p. 348-350.
- LEHR, R.V.; ELEFANTE, L.C.; KIKLY, K.K.; O'BRIEN, S.P. e KIRKPATRICK, R.B. A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in *Drosophila* S2 cells. *Protein Expression and Purification*, 2000, vol. 19, p. 362-368.
- LI, B.; TSING, S.; KOSAKA, A.H.; NGUYEN, B.; OSEN, E.G.; BACH, C.; CHAN, H. e BARNETT, J. Expression of human dopamine- β -hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells. *Biochemical Journal*, 1996, vol. 313, p. 57-64.
- LIM, H.J.; KIM, Y.K.; HWANG, D.S. e CHA, H.J. Expression of functional human transferrin in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnology Progress*, 2004, vol. 20, p. 1192-1197.
- LUA, L.H.L. e REID, S. Growth, viral production and metabolism of a *Helicoverpa zea* cell line in serum-free culture. *Cytotechnology*, 2003, vol. 42, p. 109-120.
- MAILLARD, A.P. e GAUDIN, Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *Journal of General Virology*, 2002, vol. 83, p. 1465-1476.

- MAIORELLA, B.; INLOW, D.; SHAUGER, A. e HARANO, D. Large scale insect cell culture for recombinant protein production. *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, p. 1406-1410.
- MARKS, D.M. Equipment design considerations for large scale culture. *Cytotechnology*, 2003, vol. 42, p. 21-33.
- MENDONÇA, R.Z.; PALOMARES, L.A. e RAMÍREZ, O.T. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *Journal of Biotechnology*, 1999, vol. 72, p. 61-75.
- MILLAR, N.S.; BAYLIS, H.A.; REAPER, C.; BUNTING, R.; MASON, W.T. e SATTELLE, D.B. Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. *Journal of Experimental Biology*, 1995, vol. 198, p. 1843-1850.
- MITSUHASHI, J. In: *Invertebrate Cell System Applications* (Mitsubishi J. ed.), p. 3-20, CRC Press, 1989.
- MOHAN, M.; TANEJA, T.K.; SAHDEV, S.; MOHAREER, K.; BEGUM, R.; ATHAR, M.; SAH, M.K. e HASNAIN, S.E. Antioxidants prevent UV-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. *Cell Biology International*, 2003, vol. 27, p. 483–490.
- NISHIKAWA, N.; YAMAJI, H. e FUKUDA, H. Recombinant protein production by the baculovirus-insect cell system in basal media without serum supplementation. *Cytotechnology*, 2003, vol. 43, p. 3-10.

Organização Mundial de Saúde, Disponível na Internet, <http://www.who.int/rabies/en/>, 2007.

OZTURK, S.S. E PALSSON, B.Ø. Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnology Progress*, 1990, vol. 6, p. 437-446.

PALOMARES, L.A.; GONZÁLEZ, M. e RAMÍREZ, O.T. Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, vol. 26, p. 324-331.

PARK, J.H.; CHANG, K.H.; LEE, J.M.; LEE, Y.H. e CHUNG, I. S. Optimal production and *in vitro* activity of recombinant endostatin from stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2001, vol. 37, p. 5-9.

PÉREZ, O. e PAOLAZZI, C.C. Production methods for rabies vaccine. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, vol. 18, p. 340-347.

PERRET, B.G.; WAGNER, R.; LECAT, S.; BRILLET, K.; RABUT, G.; BUCHER, B. e PATTUS, F. Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in *Drosophila* Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of g-protein coupled receptors. *Protein Expression and Purification*, 2003, vol. 31, p.123-132.

PETRIDES, D. *Bioprocess Design*, pp. 60, 2000.

PROSISE, W.W.; YAROSH-TOMAINÉ, T.; LOZEWSKI, Z.; INGRAM, R.N.; ZOU, J.; LIU, J.J.; ZHU, F.; TAREMI, S.S.; LE, H.V. e WANG, W. Protease domain of human ADAM33 produced by *Drosophila* S2 cells. *Protein Expression and Purification*, 2004, vol. 38, p. 292-301.

RAMÍREZ, O.T.; SURESHKUMAR, G.K. e MUTHARASAN, R. Bovine colostrum or milk as a serum substitute for the cultivation of a mouse hybridoma. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, vol. 35, p. 882-889.

RODRIGUES, M.I. e IEMMA, A.F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. 1ª edição, Editora Casa do Pão, 2005.

ROY, P.; URAKAWA, T.; VAN DIJK, A.A. e ERASMUS, B.J. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *Journal of Virology*, 1990, vol. 64, no. 5, p. 1998-2003.

SCHLAEGER, E.J. The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *Journal of Immunological Methods*, 1996, vol. 194, p. 191-199.

SCHNEIDER, I. Cell lines of derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1972, vol. 27, no. 2, p. 353-365.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Saúde Brasil 2004 – Uma Análise da Situação de

Saúde. Disponível na Internet, http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/capitulo6_sb.pdf, 2004.

SHEN, C.F.; HAWARI, J. e KAMEN, A. Micro-quantitation of lipids in serum-free cell culture media: a critical aspect is the minimization of interference from medium components and chemical reagents. *Journal of Chromatography B*, 2004, vol. 810, p. 119-127.

SHIN, H.S.; LIM, H.J. e CHA, H.J. Quantitative monitoring for secreted production of human interleukin-2 in stable insect *Drosophila* S2 cells using a green fluorescent protein fusion partner. *Biotechnology Progress*, 2003, vol. 19, p 152-157.

SHIN, H.S. e CHA, H.J. Statistical optimization for immobilized metal affinity purification of secreted human erythropoietin from *Drosophila* S2 cells. *Protein Expression and Purification*, 2003, vol. 28, p. 331-339.

Sindicado Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível na Internet, <http://www.sindan.org.br/informacoes/noticia.aspx?codigonoticia=575&tipo=S>, 2007.

SHULER, M.L. e KARGI, F. *Bioprocess Engineering – Basic Concepts*. Prentice Hall, 1992.

SONDERGAARD, L. *Drosophila* cells can be grown to high cell densities in a bioreactor. *Biotechnology Techniques*, 1996, vol. 10, no. 3, p. 161-166.

SUNG, Y.H.; LIM, S.W.; CHUNG, J.Y. e LEE, G.M. Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in

suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, vol. 63, p. 527-536.

SWIECH, K. Caracterização cinética e fisiológica de células de *Drosophila melanogaster* S2 para produção de glicoproteína do vírus da raiva (GPV) recombinante. São Carlos, 2007. Tese (Doutor em Engenharia Química) apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

TORFS, H.; SHARIATMADARI, R.; GUERRERO, F.; PARMENTIER, M.; POELS, J.; VAN POYER, W.; SWINNEN, E.; DE LOOF, A.; AKERMAN, K. e VANDEN BROECK, J. Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable *Drosophila* Schneider 2 cell line. *Journal of Neurochemistry*, 2000, vol. 74, p. 2182-2189.

TOTA, M.R.; XU, L.; SIROTINA, A.; STRADER, C.D. e GRAZIANO, M.P. Interaction of [fluorescein-Trp²⁵]glucagon with the human glucagon receptor expressed in *Drosophila* Schneider-2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270, p. 26466-26472.

VALLE, M.A.; KESTER, M.B.; BURNS, A.L.; MARX, S.J.; SPIEGEL, A.M. e SHILOACH, J. Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. *Cytotechnology*, 2001, vol. 35, p. 127-135.

VAN DER POL, L. e TRAMPER, J. Shear Sensitivity of Animal Cells from a Culture-Medium Perspective. *Trends in Biotechnology*, 1998, vol. 16, p. 323-328.

VAN POYER, W.; TORFS, H.; POELS, J.; SWINNEN, E.; DE LOOF, A.; AKERMAN, K. e VANDEN BROECK, J. Phenolamine-dependent adenylyl cyclase activation in

Drosophila Schneider 2 cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, vol. 31, p. 333-338.

VANDEN BROECK, J.; VULSTEKE, V.; HUYBRECHTS, R. e DE LOOF, A. Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. *Journal of Neurochemistry*, 1995, vol. 64, p. 2387-2395.

VERMA, R.; BOLETI, E. e GEORGE, A.J.T. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods*, 1998, vol. 216, p. 165-181.

WANG, D.I.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E. e LILLY, M.D. *Fermentation and enzyme technology*. John Wiley & Sons, New York, 1979.

WANG, M.Y.; PULLIAM, T.R.; VALLE, M.; VAKHARIA, V.N. e BENTLEY, W.E. Kinetic analysis of alkaline protease activity, recombinant protein production and metabolites for infected insect (Sf9) cells under different DO levels. *Journal of Biotechnology*, 1996, vol. 46, p 243-254.

WU, J. e GOOSEN, M.F.A. Insect cell damage and the protective effects of media additives in agitated and aerated cultures. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1993, vol. 105A, no. 3, p. 411-414.

WU, J. e LEE, K.D. Growth promotion by *yeastolate* and related components on insect cells. *Biotechnology Techniques*, 1998, vol. 12, no. 1, p. 67-70.

WU, J.; RUAN, Q. e PETER LAM, H.Y. Evaluation of spent medium recycle and nutrient feeding strategies for recombinant protein production in the insect cell-baculovirus process. *Journal of Biotechnology*, 1998, vol. 66, p. 109-116.

WYSS, C. e BACHMANN, G. Influence of amino acids, mammalian serum, and osmotic pressure on the proliferation of *Drosophila* cell lines. *Journal of Insect Physiology*, 1976, vol. 22, p. 1581-1586.

YOKOMIZO, A.Y.; JORGE, S.A.C.; ASTRAY, R.M.; FERNANDES, I.; RIBEIRO, O.G.; HORTON, D.S.P.Q; TONSO, A.; TORDO, N. e PEREIRA, C.A. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnology Journal*, 2007, vol. 2, p. 1-8.

APÊNDICE A

A-1: Formulações dos Meios de Cultura Desenvolvidos neste Trabalho

Tabela A1. Composição de todas as formulações testadas.

Meio	CPSL (% m/v)	YTL (g/L)	LTA (g/L)	SFB (% v/v)	LPD (% v/v)	GLC (g/L)	GLN (g/L)	PF68 (% m/v)
1	1	1	1	1	-	10	3,5	0,1
2	3	1	1	3	-	10	3,5	0,1
3	1	8	1	3	-	10	3,5	0,1
4	3	8	1	1	-	10	3,5	0,1
5	1	1	4	3	-	10	3,5	0,1
6	3	1	4	1	-	10	3,5	0,1
7	1	8	4	1	-	10	3,5	0,1
8	3	8	4	3	-	10	3,5	0,1
9	2	4,5	2,5	2	-	10	3,5	0,1
10	0,1	8	3,3	0,5	1	10	3,5	0,1
11	1	8	3,3	0,5	1	10	3,5	0,1
12	0,1	8	3,3	3	1	10	3,5	0,1
13	1	8	3,3	3	1	10	3,5	0,1
14	0,1	8	3,3	0,5	5	10	3,5	0,1
15	1	8	3,3	0,5	5	10	3,5	0,1
16	0,1	8	3,3	3	5	10	3,5	0,1
17	1	8	3,3	3	5	10	3,5	0,1
18	0,55	8	3,3	1,75	3	10	3,5	0,1
19	-	1	3,3	1	1	10	3,5	0,1
20	-	8	3,3	1	1	10	3,5	0,1
21	-	1	3,3	3	1	10	3,5	0,1
22	-	8	3,3	3	1	10	3,5	0,1
23	-	1	3,3	1	5	10	3,5	0,1
24	-	8	3,3	1	5	10	3,5	0,1

Tabela A1. Composição de todas as formulações testadas (cont.).

Meio	CPSL (% m/v)	YTL (g/L)	LTA (g/L)	SFB (% v/v)	LPD (% v/v)	GLC (g/L)	GLN (g/L)	PF68 (% m/v)
25	-	1	3,3	3	5	10	3,5	0,1
26	-	8	3,3	3	5	10	3,5	0,1
27	-	4,5	3,3	2	3	10	3,5	0,1
28	-	1	-	1	1	10	3,5	0,1
29	-	3	-	1	1	10	3,5	0,1
30	-	1	-	3	1	10	3,5	0,1
31	-	3	-	3	1	10	3,5	0,1
32	-	2	-	2	1	10	3,5	0,1

onde CPSL - concentrado protéico de soro de leite, YTL - yeastolate, LTA - lactoalbumina hidrolisada, SFB - soro fetal bovino, LPD - emulsão lipídica, GLC - glicose, GLN - glutamina e PF68 - Pluronic F68.