

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**Avaliação de Meio de Cultura para a Produção
de Interleucina-2 por Linfoblastos Murinos**

Adriana Lages Lima Galesi

Autora

Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes

Orientadora

Prof^a Dr^a Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Co-orientadora

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

Campinas-SP
Outubro/2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200306913

NIDADE	BC
º CHAMADA	T/UNICAMP
	G 132a
	EX
OMBO BC/	52539
RDC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	R\$ 11,00
DATA	13/03/03
1º CPD	

2M00180499-3

B ID 284907

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

Galesi, Adriana Lages Lima

~~G133a~~
G 132a

Avaliação de meio de cultura para a produção de interleucina-2 por linfoblastos murinos / Adriana Lages Lima Galesi.--Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadores: Ângela Maria Moraes e Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Interleucina 2. Meios de cultura (Biologia). 3. Células – Cultura e meios de cultura. I. Moraes, Ângela Maria. II. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Dissertação de Mestrado defendida por Adriana Lages Lima Galesi e aprovada em 31 de outubro de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Moraes

Orientadora

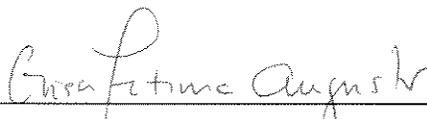


Prof.^a. Dr.^a. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Co-Orientadora

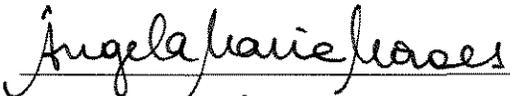


Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta



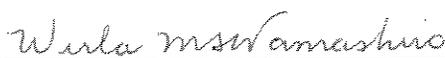
Prof.^a. Dr.^a. Elisabeth de Fátima Pires Augusto

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Moraes

Orientadora



Prof.^a. Dr.^a. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Co-Orientadora

*Aos meus pais Josemerce e Maria do Socorro, à minha irmã Carolina,
à Tê e ao meu tio Mário, pelo amor e apoio incondicional.
Ao André, pelo amor, incentivo e dedicação
em todos os momentos.*

Agradecimentos

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

A minha orientadora professora Dr^a. Ângela Maria Moraes, pela confiança, dedicação, paciência e grande contribuição na realização deste trabalho.

A minha co-orientadora professora Dr^a. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, pelo exemplo de professor e profissional e pela confiança ao longo deste trabalho.

Ao professor Dr. João Santana da Silva, do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, pela doação da linhagem celular empregada neste trabalho.

À professora Dr^a. Maria Isabel Rodrigues da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela contribuição em momentos fundamentais deste estudo.

À Dr^a. Elisabeth de Fátima Pires Augusto do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo pela contribuição e pela utilização de seu laboratório, e a todos os colegas deste instituto, em especial ao Chang, pela colaboração.

Às amigas Chrissana, Patrícia e Lóren pelo estímulo constante e pelas palavras afetuosas e positivas nos momentos mais difíceis.

Aos amigos e colegas da pós-graduação Dirce, Carla, Márcia, Ivani, Oselys, Victor, Sindelia, Isa, Marco, André, Adriano e Antenor, pela ajuda e pelo companheirismo.

À CAPES, à FAPESP, e ao FAEP, pelo apoio financeiro.

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

Resumo

As interleucinas são moléculas da família das citocinas que apresentam atividade modificadora da resposta biológica. Dentre os diferentes tipos de interleucinas já caracterizados está a interleucina-2 (IL-2), que tem um papel importante na restauração da função imunológica, sendo utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer e de doenças infecciosas.

Neste trabalho, realizou-se um estudo da composição de um meio de cultura que conduzisse a um aumento da produção de IL-2 por linfoblastos murinos linhagem EL-4. Para isso, foram avaliados os efeitos das concentrações de glutamina e dos indutores de formação de IL-2 forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e concanavalina A (Con A), dos percentuais de Pluronic F68 e soro fetal bovino (SFB) e da concentração de inóculo celular sobre a produção de IL-2 e o crescimento das células EL-4. Para a avaliação dos efeitos destas variáveis utilizou-se a metodologia de planejamento experimental. Os ensaios foram realizados primeiramente de maneira estática, em placas de cultura, e, após a obtenção da formulação do meio de cultura mais adequada, realizaram-se ensaios cinéticos, em maior escala, em frascos do tipo *spinner*.

Nos estudos realizados utilizando-se a metodologia do planejamento experimental, verificou-se que a concentração de IL-2 mostrou uma tendência de aumento com a elevação da concentração de PMA, enquanto a viabilidade celular diminuiu com a presença de soro fetal bovino. Na avaliação do efeito da adição de Con A, em conjunto com o PMA, observou-se que não houve sinergia entre os dois compostos e que a capacidade da Con A de induzir a produção de IL-2 foi menor que a do PMA. A maior concentração de IL-2, obtida em um ensaio estático após 40 horas de cultivo, foi de 162 ng/mL, empregando-se PMA a 856 ng/mL e uma percentagem de SFB de 1,45%.

Ensaio cinéticos em frascos *spinner* foram realizados para a avaliação do comportamento celular em uma cultura agitada em uma escala maior. Verificou-se que a produção de IL-2 apresentou valores abaixo dos obtidos anteriormente.

Palavras-chave: interleucina-2, linfoblastos, composição de meio de cultura, células animais

Abstract

Interleukins are molecules from the group of the cytokines that are capable of changing the biological response. Interleukin-2 is among the different types of already characterized interleukins and has an important role in immunological function restoration, being used in the treatment of some types of cancer and infectious diseases.

In this work, a study of the composition of a culture medium was performed, aiming at increasing the productivity of IL-2 by suspended EL-4 cells. For that, the effects of glutamine concentration (carbon and nitrogen source), phorbol-12-myristate-13-acetate and concanavalin A concentrations (IL-2 production stimulants), Pluronic F68 percentage (a cell-protecting additive against shear damage), fetal calf serum percentage, and cell concentration on IL-2 production and cell growth were evaluated, using the experimental design strategy. The experiments were initially performed statically, in cell culture plates, and, after the most adequate culture medium composition was determined, kinetic experiments were carried out in larger scale, in spinner flasks.

In the studies employing the experimental design strategy, IL-2 concentration increased with an increment in PMA concentration, and cell viability decreased increasing fetal calf serum percentage. In the experiments in which the effect of concanavalin A in association with PMA over IL-2 production was studied, it was observed that these stimulants did not have synergetic effect and that the induction capacity of Con A was less than that of PMA. The maximum IL-2 production was obtained in an static experiment and was around 162 ng/mL in the presence of 856 ng/mL PMA and 1.45% SFB.

Kinetic experiments in spinner flasks were performed for the evaluation of cell behavior in a stirred culture in larger scale. It was observed that IL-2 production was less than that determined in the previous experiments.

Key-words: interleukin-2, linfoblasts, culture medium composition, animal cells

Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Nomenclatura e Abreviações	xvi
Capítulo I: Introdução	1
Capítulo II: Objetivo	4
Capítulo III: Revisão da Literatura	5
3.1. Considerações Gerais sobre o Cultivo de Células Animais	5
3.2. Influência das Condições Ambientais no Cultivo de Células de Mamíferos	9
3.3. Biorreatores para o Cultivo de Células de Mamíferos	13
3.4. Escalonamento de Culturas de Células de Mamíferos	16
3.4.1. Meios e Nutrientes	17
3.4.2. Tamponamento do Meio de Cultura	17
3.4.3. Oxigênio	18
3.5. Aspectos Relevantes Relativos à Produção e à Aplicação de Interleucina-2	21
3.5.1. Interleucina-2 Humana	22
3.5.2. Interleucina-2 de Camundongo	23
3.5.3. Produção de Interleucina-2 por Células Animais em Cultivo	24
3.6. Planejamento Experimental e seu Papel na Otimização de Meios de Cultura	29
Capítulo IV: Materiais e Métodos	31
4.1. Materiais	31
4.1.1. Linhagem Celular	31

4.1.2. Componentes do Meio de Cultura e Outros Reagentes.....	31
4.2. Métodos.....	32
4.2.1. Manutenção e Propagação da Linhagem Celular	32
4.2.2. Avaliação do Crescimento Celular na Ausência do Indutor de Interleucina-2	32
4.2.3. Avaliação Preliminar da Cinética de Crescimento Celular	33
4.2.4. Estudo das Variáveis Relevantes na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular	33
4.2.5. Estudo das Variáveis Concentração de PMA e de SFB na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular	34
4.2.6. Estudo do Efeito da Adição de Concanavalina A em conjunto com PMA na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular	35
4.2.7. Avaliação do Efeito da Ampliação da Faixa de Concentração de PMA sobre a Produção de Interleucina-2.....	35
4.2.8. Ampliação da Escala de Cultivo.....	36
4.2.9. Metodologia Analítica.....	37
4.2.9.1. Acompanhamento do Crescimento e Viabilidade Celular	37
4.2.9.2. Determinação da Atividade de Interleucina-2	38
4.2.9.3. Determinação da Concentração de Glicose.....	39
4.2.9.4. Determinação da Concentração de Ácido Lático.....	39
4.2.9.5. Determinação da Concentração de Amônio	40
4.2.9.6. Determinação da Concentração de Aminoácidos	40
Capítulo V: Resultados e Discussão	41
5.1. Caracterização Preliminar da Cultura	41
5.1.1. Efeito da Concentração de Inóculo no Crescimento Celular.....	41
5.1.2. Influência da Concentração de Soro Fetal Bovino no Crescimento Celular	43
5.1.3. Ensaio Cinético para Avaliação do Período de Coleta das Amostras.....	44
5.2. Efeitos das Concentrações de PMA, Pluronic F68, Soro Fetal Bovino, Inóculo e	

Glutamina	46
5.3. Planejamento Experimental para Otimização da Composição do Meio de Cultura.....	51
5.3.1 Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Concentração de Interleucina-2	53
5.3.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Viabilidade Celular	56
5.3.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Concentração de Células Total	58
5.3.4. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Produção Específica ...	59
5.4. Efeito da Adição de Concanavalina A e PMA na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular.....	62
5.4.1. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a Concentração de Interleucina-2	63
5.4.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a Viabilidade Celular	65
5.4.3. Análise dos efeitos das concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a concentração de células total	66
5.4.4. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a Produção Específica de IL-2	67
5.5. Avaliação do Efeito da Ampliação da Faixa de Concentração de PMA sobre a Produção de Interleucina-2.....	68
5.6. Ampliação da Escala de Cultivo.....	70
Capítulo VI: Conclusões e Sugestões	78
6.1. Conclusões.....	78
6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	80
Capítulo VII: Referências Bibliográficas.....	81

Lista de Figuras

Figura 3.1: Ciclo celular (adaptada de Darnell e col., 1990).	7
Figura 3.2: Principais vias do metabolismo celular (Shuler e Kargi, 1992).	12
Figura 3.3: Perfis cinéticos da variação da concentração de nutrientes, células e produtos em função do tempo em biorreatores operando em modo batelada, quimiostato e batelada alimentada.	17
Figura 3.4: Estrutura química do Pluronic F68.	20
Figura 3.5: Estrutura química do forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).	25
Figura 5.1: Efeito da concentração de inóculo celular no crescimento (a) e na viabilidade (b) das células EL-4. As células foram inoculadas em frascos T-25 com 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO ₂	42
Figura 5.2: Influência da concentração de SFB no crescimento (a) e na viabilidade (b) celular. As células EL-4 foram inoculadas a uma concentração de 5,0 x 10 ⁵ cel/mL em frascos T-25 com meio de cultura RPMI-1640. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO ₂	44
Figura 5.3: Ensaio cinético com monitoramento da concentração de IL-2 produzida e concentração de células viáveis. Os ensaios foram realizados em placas de cultura com 6 poços, e estas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO ₂ . As células foram inoculadas a uma concentração de 4,5 x 10 ⁵ cel/mL e a concentração de PMA era de 505 ng/mL.	45
Figura 5.4: Contrastes das variáveis independentes sobre a concentração de IL-2 e a viabilidade celular obtidas com a realização do planejamento fatorial fracionário do tipo 2 ⁵⁻¹ descritos nas Tabelas 5.3 e 5.4.	50

Figura 5.5: Superfície de resposta para a concentração de IL-2 obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 sem pontos axiais.	56
Figura 5.6: Superfície de resposta para a viabilidade celular obtida com o planejamento fatorial completo 2^2	60
Figura 5.7: Efeito de diferentes concentrações de PMA (500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL) sobre a concentração de IL-2 produzida e a viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em placas de cultura com 6 poços, e estas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO ₂ . As células foram inoculadas a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células viáveis por mililitro.....	69
Figura 5.8: Ensaio cinético com monitoramento da concentração de IL-2 (a) e de células totais e viabilidade celular (b). Os ensaios foram realizados em frasco <i>spinner</i> mantido a 37°C, com 5% de CO ₂ . As células foram inoculadas a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ cel/mL.	72
Figura 5.9: Monitoramento das concentrações de glicose, ácido lático (a) e amônio (b) em ensaio realizado em frasco <i>spinner</i>	73
Figura 5.10. Variação das concentrações de aminoácidos para o Ensaio 2.....	74
Figura 5.11: Ensaio cinético com monitoramento da concentração de IL-2 (a) e de células totais e viabilidade celular (b). Os ensaios foram realizados em placas de 6 poços mantidas a 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO ₂ . As células foram inoculadas a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ cel/mL.....	75

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Principais produtos obtidos pelo cultivo de células animais (adaptada de Shuler e Kargi, 1992).....	6
Tabela 3.2. Modelos não estruturados utilizados para prever a taxa de crescimento celular de hibridomas (adaptada de Pörtner e Schäfer, 1996).....	14
Tabela 4.1: Resumo dos experimentos realizados.....	37
Tabela 5.1: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}	47
Tabela 5.2: Resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} efetuado nas condições descritas na Tabela 5.1.....	48
Tabela 5.3: Contrastes obtidos para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento fracionário 2^{5-1}	49
Tabela 5.4: Contrastes obtidos para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}	49
Tabela 5.5: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais.	51
Tabela 5.6: Planejamento fatorial completo 2^2 com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais.	52
Tabela 5.7: Efeitos obtidos para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento completo 2^2	53
Tabela 5.8: Coeficientes de regressão para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento completo 2^2 sem pontos axiais.....	56
Tabela 5.9: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de IL-2 para o planejamento completo 2^2 sem pontos axiais.....	55

Tabela 5.10: Valores experimentais e preditos pelo modelo para a concentração de IL-2 para o planejamento completo 2^2 sem pontos axiais. Os efeitos das concentrações de SFB e PMA foram estudados nas faixas de 1,45 a 8,55% e de 153,93 e 856,06 ng/mL, respectivamente.	55
Tabela 5.11: Efeitos obtidos para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^2	57
Tabela 5.12: Coeficientes de regressão para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento completo 2^2	57
Tabela 5.13: Análise de variância (ANOVA) para a viabilidade celular para o planejamento completo 2^2	58
Tabela 5.14: Valores experimentais e preditos pelo modelo para a viabilidade celular para o planejamento completo 2^2	59
Tabela 5.15: Efeitos obtidos para a concentração de células total após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^2	60
Tabela 5.16: Efeitos obtidos para a produção específica após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^2	61
Tabela 5.17: Análise de variância (ANOVA) para a produção específica para o planejamento fatorial completo 2^2	61
Tabela 5.18: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 4 pontos centrais.	63
Tabela 5.19: Planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 4 pontos centrais.	64
Tabela 5.20: Efeitos obtidos para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^3	65
Tabela 5.21: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de IL-2 para o planejamento fatorial completo 2^3	65

Tabela 5.22: Efeitos obtidos para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^3	66
Tabela 5.23: Análise de variância (ANOVA) para a viabilidade celular para o planejamento fatorial completo 2^3	67
Tabela 5.24: Efeitos obtidos para a concentração de células total após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^3	67
Tabela 5.25: Efeitos obtidos para a produção específica após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^3	68
Tabela 5.26: Comparação dos resultados obtidos nos ensaios cinéticos em batelada em placas estáticas de poliestireno e em biorreator do tipo <i>spinner</i>	77

Nomenclatura e Abreviações

- AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Amon: Concentração de amônia
ATCC: *American Type Culture Collection*
C: Concentração
Cel: células
CHX: Cicloheximida
CMC: Concentração Micelar Crítica
CO₂: Dióxido de Carbono
Con A: Concanavalina A
Conc: Concentração
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Dexoxirribonucleico
EDTA: do inglês *Ethylenediamine-tetraacetic Acid*
ELISA: do inglês *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*
GLC: Concentração de glicose
GLN: Concentração de glutamina
GM-CSF: Fator de estimulação de colônia granulócito-macrófago
[H⁺]: concentração de prótons
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico]
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance
IFN- γ : Interferon- γ
IL-1: Interleucina-1
IL-2: Interleucina-2
IL-4: Interleucina-4
IL-5: Interleucina-5
IL-6: Interleucina-6
IPT: Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Lac: Concentração de lactato

μ : Velocidade específica de crescimento

μ_{\max} : Velocidade máxima específica de crescimento

NaHCO₃: Bicarbonato de Sódio

NIBSC/WHO: *National Institute for Biological Standards and Control/World Health Organization*

O₂: Oxigênio

pH: Potencial Hidrogênio Iônico

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

SFB: Soro Fetal Bovino

TCA: Ácido Tricloroacético

VT: Vomitoxina

Capítulo I

Introdução

Os tratamentos convencionais utilizados no combate ao câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Entretanto, estes tratamentos não eliminam somente as células tumorais, afetando também outras células do corpo, e não são efetivos para alguns tipos de câncer. Para solucionar estes problemas, novos tipos de tratamento têm sido desenvolvidos.

Uma área de pesquisa relativamente recente é a imunoterapia. Esta estratégia terapêutica promove a estimulação do sistema imunológico através de substâncias modificadoras da resposta biológica. Com o estímulo, ocorre uma restauração da função imunológica, o que intensifica a resistência ao crescimento tumoral (Instituto Nacional do Câncer, 2002).

Uma das substâncias que modificam a resposta biológica é a interleucina-2. A IL-2 é um fator de crescimento autócrino e parácrino que é secretado por linfócitos T ativados e é essencial para a proliferação das células T. Esta linfocina foi descoberta em 1976 em virtude de sua habilidade em aumentar a produção de linfócitos T humanos e viabilizar o crescimento contínuo das células T normais em cultivo (Stites e col., 1994). A descoberta da IL-2 (então chamada de fator de crescimento das células T) representou um grande avanço na imunologia, pois tornou possível pela primeira vez propagar e estudar clones individuais das células T normais mantendo suas propriedades imunológicas.

Seu papel essencial na proliferação das células T, junto com seus efeitos sobre a produção de citocinas e sobre as propriedades funcionais das células B, macrófagos e células NK, coloca a IL-2 como uma das citocinas imunorregulatórias mais importantes. Esta proteína é a mais bem caracterizada de todas as interleucinas, tendo um papel fundamental no funcionamento imunológico normal, e está se tornando um dos produtos biofarmacêuticos mais utilizados desde a década de 1990. Esta molécula liga-se à superfície

das células T, estimulando a sua multiplicação e a atividade biológica dessas células, tornando-as capazes de eliminar as células cancerosas.

A interleucina-2 tem sido usada no tratamento de alguns tipos de câncer, como melanoma maligno, sarcomas, carcinoma de cólons e reto e adenocarcinoma de pulmão (Rosenberg, 2001; Instituto Nacional do Câncer, 2002). Mais recentemente, a efetividade aparente da IL-2 no tratamento de várias doenças infecciosas, em particular aquelas resistentes aos tratamentos convencionais, tem intensificado o interesse médico nesta proteína. Sua efetividade no tratamento da AIDS tem gerado um particular interesse (Walsh e Headon, 1994). Entretanto, a toxicidade e os efeitos colaterais desta citocina ainda estão em estudo. A interleucina-2 produzida neste trabalho tem origem murina e poderia ser empregada em testes *in vivo* realizados em camundongos.

O fato desse composto ser naturalmente excretado em pequenas quantidades pelas células T ativadas dificulta o uso deste tipo de célula para sua produção em larga escala. Assim, para a produção desta interleucina em quantidades mais expressivas, pode-se utilizar diversas linhagens de células superprodutoras da citocina, entre as quais destacam-se as células tumorais e as recombinantes.

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.

Desta forma, estudos de meios de cultura com formulações adequadas para a formação de um produto de interesse, como a interleucina-2, têm recebido especial atenção, sendo também o foco principal de estudo deste trabalho. Neste estudo, avaliou-se o efeito das concentrações da glutamina, fonte de carbono e nitrogênio, do forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), estimulador de produção de interleucina-2, do Pluronic F68, agente de estabilização das células ao cisalhamento, e do percentual de soro fetal bovino na produção de interleucina-2. A adição de concanavalina A, em conjunto com o PMA, também foi avaliada. Por ser bastante utilizada como modelo de célula T, a linhagem celular EL-4, linfoblastos de camundongos, foi empregada. Essas células secretam IL-2 em quantidades apreciáveis quando devidamente estimuladas.

A literatura registra diversos estudos acerca da composição de meios que favorecem a produção de IL-2 por células EL-4 (Farrar e col., 1980; Lasek e col., 1989; Dong e col., 1994; Yu e col., 1996), entretanto, os estudos são fundamentalmente univariáveis e não permitem que os efeitos de interação entre os compostos estudados sejam avaliados.

O estimulador forbol-12-miristato-13-acetato é bastante utilizado para induzir a produção de IL-2 por células produtoras desta interleucina. Seu mecanismo de ação sobre as células EL-4 está provavelmente relacionado à prevenção da entrada das células na fase S, mantendo-as na fase G₁, onde ocorre a maior produção do fator, e inibindo a utilização da IL-2 como seu próprio fator de crescimento na fase S (Farrar e col., 1980). Outro indutor bastante utilizado é a concanavalina A, uma lectina obtida da mamoma. Este composto ativa as células T através de sua ligação a moléculas de superfície envolvidas nessa ativação. Outros indutores como succinato de vitamina E, vomitoxina e cicloheximida, também podem ser empregados em conjunto com o PMA para a produção de interleucina-2.

Assim, utilizando-se ativadores celulares, é possível encontrar as condições apropriadas para o desenvolvimento das células EL-4 em biorreatores do tipo tanque agitado, obtendo-se o produto de interesse em quantidades apreciáveis, se meios de cultura com composições adequadas forem empregados. As citocinas produzidas, em particular a interleucina-2, poderiam ser utilizadas em testes *in vivo*, visto que são virtualmente idênticas às produzidas por camundongos saudáveis (Farrar e col., 1980).

Capítulo II

Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de um meio de cultura que propicie as condições adequadas para a formação do produto desejado, interleucina-2, em quantidades apreciáveis, por linfoblastos de camundongos da linhagem EL-4, cultivados de maneira estática e em suspensão, empregando a metodologia de planejamento fatorial. Inseridos neste objetivo global estão os seguintes objetivos específicos:

1. Estudo do comportamento das células quanto ao crescimento celular e à formação de interleucina-2 em meios com níveis reduzidos ou livres de soro fetal bovino.
2. Avaliação do efeito da concentração de glutamina, do agente de estabilização ao cisalhamento Pluronic F68, do soro fetal bovino, dos estimuladores da produção de interleucina-2 forbol-12-miristato-13-acetato e concanavalina A e da concentração de inóculo na produção de interleucina-2 e no comportamento celular.
3. Avaliação do efeito sinérgico da concanavalina A e do forbol-12-miristato-13-acetato na indução da produção de interleucina-2.
4. Avaliação do comportamento celular e da produção de interleucina-2 em um cultivo em batelada em maior escala, em frascos agitados do tipo *spinner*.

Capítulo III

Revisão da Literatura

3.1. Considerações Gerais sobre o Cultivo de Células Animais

As técnicas de cultivo utilizadas para as células animais são similares às aquelas usadas para o cultivo de bactérias, fungos e leveduras, apesar das células animais apresentarem características diferentes das apresentadas pelos microrganismos. Em geral, o crescimento de células animais é mais lento, as células são mais frágeis mecanicamente, necessitam de meios de cultura complexos e de suportes especiais para que haja o crescimento (Augusto e Oliveira, 2001).

No cultivo de células animais, os tecidos extraídos diretamente de órgãos de animais sob condições assépticas são transferidos para um meio de crescimento contendo soro e pequenas quantidades de antibióticos. Esta cultura primária de células é geralmente heterogênea e possui uma baixa taxa de crescimento, mas representa bem o tipo de célula do tecido do qual foi derivada (Shuler e Kargi, 1992). Dentre os tipos de células que são cultivadas *in vitro* estão células de insetos, de humanos, de camundongos, de ratos e de outros mamíferos.

Os produtos obtidos pelo cultivo de células animais são geralmente proteínas de alta massa molecular com ou sem grupos glicosídicos. A Tabela 3.1 mostra os principais produtos obtidos a partir de células animais.

Em um animal ou em uma cultura, as células estão em crescimento ou quiescentes. O crescimento celular envolve um aumento na massa que faz com que a célula se divida, fenômeno que não ocorre com as células quiescentes. Tais células realizam as funções características dos tecidos. O crescimento celular é um processo regulado, de forma que a

fração de células em crescimento em um certo tecido é função da idade do organismo e das propriedades do tecido.

Tabela 3.1: Principais produtos obtidos pelo cultivo de células animais (adaptada de Shuler e Kargi, 1992).

Produtos	Exemplos
Imunobiológicos	Anticorpos Monoclonais Citocinas
Vacinas Virais	Poliomielite Rubéola Febre amarela
Antígenos da Superfície Celular	
Hormônios	Hormônio de crescimento Insulina Calcitonina
Enzimas	Fatores sangüíneos VIII e IX Hialuronidase Colagenase
Inseticidas Biológicos	Baculovirus
Fatores de Crescimento	Fator de crescimento derivado de plaquetas Fator de crescimento epitelial Fatores de crescimento como insulina
Células, Tecidos e Órgãos	

O crescimento celular envolve dois eventos facilmente reconhecidos e coordenados: a duplicação do DNA e a divisão física da célula em duas células-filhas. Assim, o ciclo celular pode ser dividido em quatro períodos: a fase G₁ (primeiro intervalo), período entre a divisão nuclear e o início da síntese de DNA; a fase S (de síntese), onde ocorre a síntese de DNA; a fase G₂ (segundo intervalo), período entre a duplicação do DNA e a divisão nuclear; e a fase M (mitótica), o período de mitose, durante o qual os cromossomos duplicados se separam para dar origem a duas células-filhas. A Figura 3.1 ilustra o ciclo celular. Algumas células, as células quiescentes, não se dividem, interrompendo seu ciclo

logo antes da fase S. Tais células permanecem em estado G_0 , em repouso, e apenas uma estimulação do crescimento faz com que elas entrem na fase S, sintetizando um novo complemento de DNA (Darnell e col., 1990).

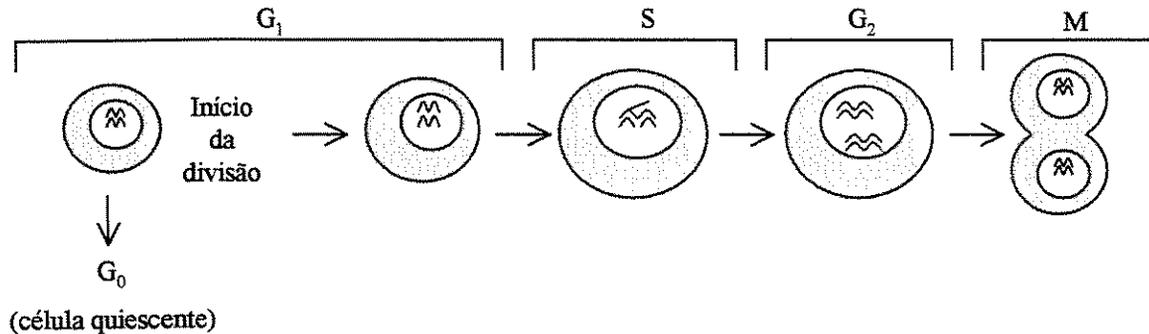


Figura 3.1: Ciclo celular (adaptada de Darnell e col., 1990).

A duração do ciclo celular e de seus períodos varia entre diferentes tipos celulares. Células embrionárias podem se dividir tão frequente e rapidamente quanto células bacterianas, uma vez a cada 15-20 minutos. Já o ciclo celular dos mamíferos dura entre 10 e 30 horas. As fases S, G₂, e M juntas necessitam de um tempo fixo de cerca de 10 horas, e a duração da fase G₁ é variável (Darnell e col., 1990).

Algumas das vantagens do cultivo de células animais são o controle do ambiente, a caracterização e homogeneidade da amostra e a economia global (Freshney, 1994). Estes aspectos serão sucintamente discutidos a seguir.

Uma grande vantagem do cultivo de células animais é a possibilidade da realização de controle físico-químico adequado do ambiente (pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O₂ e de CO₂) e das condições fisiológicas que, apesar de não serem sempre bem definidas, podem ser mantidas constantes.

As amostras de tecidos animais são sempre heterogêneas, pois estes variam quanto às células constituintes. Com as subculturas em meios específicos que podem inibir ou favorecer o crescimento celular, as células tornam-se mais homogêneas, pois são agitadas em cada transferência e tendem a se tornar uma cultura homogênea com células mais robustas. Além de seu significado biológico, a homogeneidade tem também uma

considerável importância prática, pois a cultura pode ser propagada, caracterizada e armazenada, e um aumento potencial no número e na uniformidade das células proporciona uma faixa muito mais larga de possibilidades experimentais.

Com o cultivo de células *in vitro*, os nutrientes podem apresentar concentrações definidas e mais baixas, pois o acesso às células é direto. Já para experimentos *in vivo*, mais de 90% do material administrado ao animal para a realização do estudo pode ser perdido por excreção e pela distribuição para tecidos que não serão estudados.

O cultivo de células animais também apresenta algumas limitações como a complexidade, a obtenção de pequenas quantidades de produto e a instabilidade (Freshney, 1994). Em adição, o cultivo celular deve ser realizado sob condições assépticas rigorosas, pois as células animais crescem mais lentamente que muitos dos contaminantes mais comuns, como bactérias e fungos.

Além disso, ao contrário de alguns microrganismos, as células animais não ocorrem naturalmente de forma isolada e, conseqüentemente, não são capazes de sustentar sua existência independente sem um ambiente complexo simulando o plasma sangüíneo ou um fluido intersticial. Isto implica então em um nível de habilidade e entendimento para compreender as necessidades do sistema e diagnosticar problemas.

Outra limitação do cultivo de células animais é o esforço e o gasto com materiais que são empregados no cultivo celular para a obtenção de pequenas quantidades de produto. Além disso, as diferenças nas taxas de crescimento celular podem produzir variabilidade em subculturas, mesmo que as culturas sejam estáveis geneticamente.

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 seja realizado de maneira criteriosa, visando elevadas produtividades, baixo custo e simplicidade operacional.

3.2. Influência das Condições Ambientais no Cultivo de Células de Mamíferos

Dentre os diversos fatores que influenciam o cultivo celular, pode-se destacar a natureza do suporte, o pH, a temperatura, a composição da fase gasosa e do meio de cultura (Freshney, 1994).

A fase sobre a qual as células se desenvolvem pode ser sólida (plásticos ou vidros); semi-sólida, como em um gel (colágeno ou ágar); ou líquida, como em uma cultura em suspensão. As células que dependem de suporte são chamadas de aderentes, e se desenvolvem somente sobre um suporte sólido. Tais células crescem em monocamadas e apresentam inibição por contato. Células suspensas não dependem de um suporte sólido e desenvolvem-se livremente no meio de cultura (Walsh e Headon, 1994).

Para células que crescem continuamente em suspensão, ou porque não aderem ou porque são mantidas em suspensão mecanicamente, o processo de cultivo é mais rápido e menos traumático para as células. A manutenção da cultura pode ser feita apenas com a adição de meio, sem a necessidade de sub-cultivo. Além disso, a produção e a obtenção de grandes quantidades de células pode ser alcançada sem o aumento da área superficial do suporte e, com uma diluição contínua e a concentração celular mantida constante, um estado estacionário pode ser alcançado, o que não ocorre no cultivo em monocamada (Freshney, 1994).

As culturas mantidas mecanicamente em suspensão proporcionam um escalonamento mais fácil, pois as mudanças estão mais relacionadas com o grau de controle do ambiente e com a manutenção das condições fisiológicas corretas para o crescimento celular do que com a alteração do tamanho do frasco. Já o escalonamento de sistemas em monocamada ou de culturas em suspensão estática é mais complexo, pois é necessário aumentar a área superficial disponível para as células em relação ao meio e ao volume total da cultura (Freshney, 1989).

Em qualquer uma destas fases, o pH adequado para o desenvolvimento da maioria das células de mamíferos é de cerca de 7,4, e não pode cair a um valor abaixo de 7,0 durante o cultivo. Um pH menor que 6,8 é geralmente inibidor do crescimento celular

(Freshney, 1989). Assim, utilizam-se agentes tamponantes como o HEPES e ar enriquecido com 5% de CO₂ para auxiliar no tamponamento do meio.

A temperatura também tem influência sobre o pH devido a um aumento da solubilidade de CO₂ a baixas temperaturas. Além disso, tem um efeito direto no crescimento celular, ou seja, o crescimento das células passa por um ponto ótimo com relação à temperatura. A temperatura ideal é de aproximadamente 37°C.

Quando uma célula é removida de seu tecido original e colocada em cultura, o meio, idealmente, deve prover as condições ambientais a que a célula estava exposta *in vivo*; assim, ela será capaz de sobreviver, proliferar-se e diferenciar-se (Freshney, 1989). Um meio líquido típico para o cultivo de células de mamíferos contém soro sanguíneo (5% a 20%), sais inorgânicos, fontes de nitrogênio, fontes de carbono e energia, vitaminas, micronutrientes, fatores de crescimento, agentes tamponantes, indicador de pH, antibióticos e água. O soro, normalmente proveniente de fetos bovinos, é uma mistura complexa de várias biomoléculas com diferentes atividades promotoras e inibidoras de crescimento. Dentre elas estão aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas, hormônios, lipídios e minerais. 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 e lipídios (Freshney, 1994).

O soro é um componente de alto custo no meio de cultura, e pode causar dificuldades nos processos de separação e purificação do bioproduto de interesse, devendo ser evitado em culturas que produzem proteínas terapêuticas e diagnósticas (Chisti, 2000). O soro pode contaminar o produto com vários agentes que não são facilmente detectados. A variabilidade do soro é outra limitação, já que a utilização de soro de diferentes fornecedores, ou até mesmo de lotes distintos, dificulta a reprodutibilidade do cultivo. Devido às desvantagens de meios com soro, meios livres de soro foram desenvolvidos. Este tipo de meio geralmente contém sais inorgânicos, fontes de carbono e de nitrogênio, vitaminas, fatores de crescimento e hormônios. Utilizando-se um meio livre de soro, pode-se reduzir seu custo, eliminar alguns problemas na purificação do produto, promover a reprodutibilidade dos resultados, e reduzir o risco de contaminação. Diferentes linhagens

celulares requerem diferentes composições do meio livre de soro, mas nem todas as células se adaptam a estes meios (Shuler e Kargi, 1992).

A glicose está presente na maioria dos meios de cultivo como fonte de energia, sendo metabolizada principalmente pela glicólise, formando o piruvato, o qual pode ser convertido em lactato ou acetoacetato e entrar no ciclo do ácido cítrico, formando CO_2 . Este metabolismo da glicose faz com que haja um acúmulo destes compostos, pois ela é geralmente metabolizada a uma taxa maior que a necessária. Então, este composto não deve ser adicionado em quantidades maiores que 2 g/L no meio de cultura, sendo melhor acrescentá-lo durante o cultivo (Freshney, 1989). Uma alternativa seria substituir a glicose por galactose ou frutose pois haveria uma redução significativa da produção de ácido láctico, mas isso geralmente resulta em menor taxa de crescimento. Entretanto, o acúmulo de ácido láctico *in vitro* pode ter um significado biológico distinto daquele que tem *in vivo*. Há indicações de que a maior fonte de carbono é a glutamina, e não a glicose (Freshney, 1994). No metabolismo de uma célula animal, a glutamina converte-se em amônia e glutamato, e o glutamato, por sua vez, é convertido em outros aminoácidos. A amônia, juntamente com o ácido láctico, é um dos principais inibidores do crescimento celular e da formação de produtos de interesse. A Figura 3.2 mostra as principais vias do metabolismo celular.

Os efeitos das condições ambientais são comumente modelados matematicamente para viabilizar a predição de resultados experimentais, a otimização das condições de cultivo e o estudo de processos metabólicos fundamentais.

Os modelos matemáticos utilizados para descrever o crescimento celular e a formação do produto de interesse podem ser classificados como não-estruturados, que não consideram os processos intracelulares, estruturados, onde o metabolismo celular é levado em consideração, não-segregados, que ignoram a distribuição de propriedades metabólicas entre as células, e segregados, que estabelecem que nem todos os membros da população são idênticos. Os modelos estruturados podem ser aplicados para uma grande faixa de condições experimentais, enquanto os não-estruturados são utilizados apenas com os dados do processo do qual foi derivado (Pörtner e Schäfer, 1996). Os modelos matemáticos derivados de planejamentos fatoriais são não-estruturados e não-segregados.

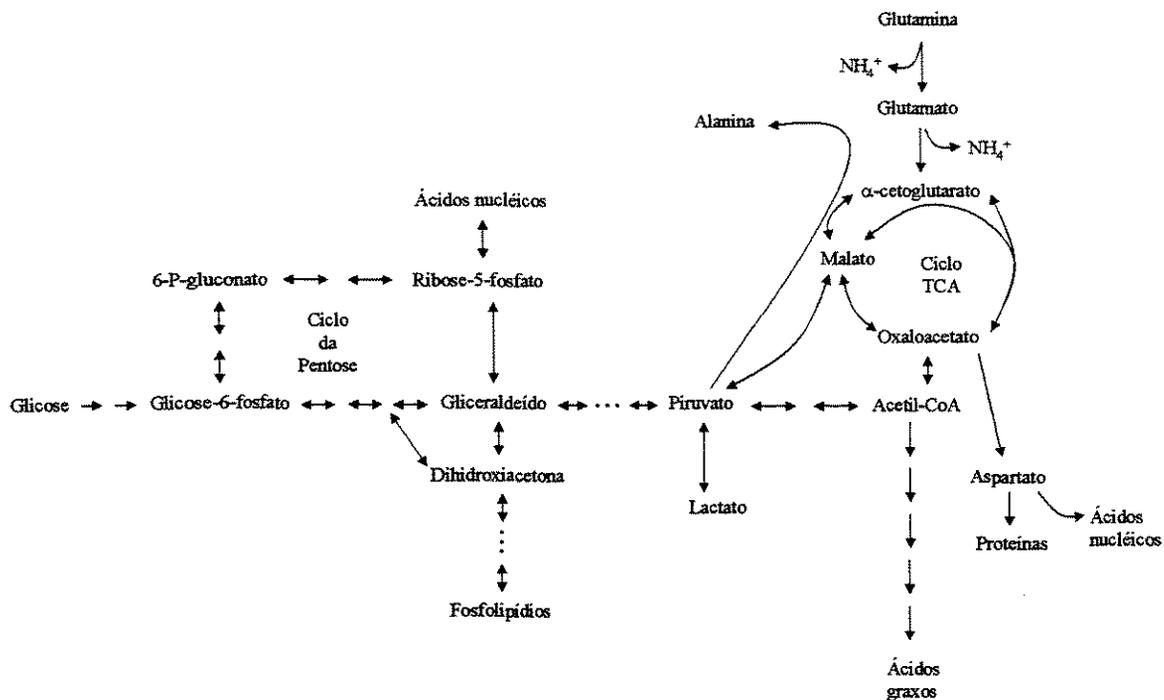


Figura 3.2. Principais vias do metabolismo celular (Shuler e Kargi, 1992).

As variáveis geralmente monitoradas para a proposição de modelos são a concentração e a viabilidade celular, a concentração de produto e as concentrações dos substratos glicose e glutamina e dos metabólitos ácido láctico e amônio. Para processos contínuos, além destas variáveis, inclui-se a taxa de diluição. A precisão na determinação destas variáveis deve ser avaliada para se obter a margem de erro do modelo proposto, considerando-se também a variabilidade entre os ensaios.

Para culturas perfeitamente agitadas, Pörtner e Schäfer (1996) propõem que o erro associado à taxa de diluição é de cerca de 5% e pode afetar todas as variáveis dependentes. A concentração e a viabilidade celular são freqüentemente determinadas por exclusão de azul de Trypan, método que tem uma baixa precisão (erro de 7%), especialmente em concentrações celulares muito baixas ou muito elevadas. A detecção de produtos como anticorpos por métodos como o ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) tem erro estimado na ordem de 10%. A determinação das concentrações de glicose e ácido láctico por analisadores clínicos ou kits enzimáticos tem erro de cerca de 2%, e a utilização de HPLC e de kits enzimáticos para a dosagem de amônio e glutamina apresenta erro de 5%.

Um dos modelos mais utilizados para prever a taxa de crescimento específico é o de Monod, que é simples e descreve bem o crescimento celular exponencial. Sistemas onde o crescimento celular é lento e a densidade populacional é baixa são bem representados pela equação de Monod. Neste modelo não-estruturado e não-segregado, a taxa de crescimento celular é baseada na disponibilidade de um único substrato e no seu consumo a uma taxa constante.

Algumas correlações mais complexas originaram-se do modelo de Monod e utilizam mais de um substrato como substrato limitante. As principais fontes de carbono e nitrogênio são a glicose e a glutamina, respectivamente, e os modelos cinéticos são geralmente baseados nestes compostos.

A influência de inibidores de crescimento presentes no meio de cultura na taxa de crescimento celular também é predita por alguns modelos. Esta inibição pode ser causada por altas concentrações de substrato, produto ou componentes tóxicos (como amônia e lactato). Com a presença de substâncias inibidoras no meio de cultura, o crescimento celular decai e a taxa de crescimento mostra-se dependente da concentração do inibidor.

Pörtner e Schäfer (1996) analisam e discutem diversos modelos não estruturados para hibridomas propostos na literatura. Eles mostram que além do erro analítico ou do erro causado por mudanças metabólicas, o modelo pode ser não preditivo devido à falta de entendimento do metabolismo real. A maioria dos modelos utiliza apenas um ou dois substratos limitantes do crescimento, e podem levar a conclusões e modelos incorretos se utilizados fora da faixa estudada. Para a obtenção de correlações cinéticas precisas, uma composição adequada de meio de cultura deve ser escolhida para a obtenção de diversos dados que representem toda a faixa das condições do processo. A Tabela 3.2 traz algumas correlações para a taxa de crescimento celular de hibridomas.

3.3. Biorreatores para o Cultivo de Células de Mamíferos

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 hibridoma (Augusto e Oliveira, 2001).

Tabela 3.2. Modelos não estruturados utilizados para prever a taxa de crescimento celular de hibridomas (adaptada de Pörtner e Schäfer, 1996).

Equação de Monod	$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S}$	
Equação de Trembley e colaboradores	$\mu = \mu_{\max} \frac{Glc}{K_{Glc} + Glc} \frac{Gln}{K_{Gln} + Gln}$	$\mu_{\max} = 1,09 \text{ d}^{-1}$ $K_{Glc} = 1 \text{ mM}$ $K_{Gln} = 0,3 \text{ mM}$
Equação de Kurokawa e colaboradores	$\mu = \mu_{\max} \frac{Glc}{K_{Glc} + Glc} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac} + Lac}$	$\mu_{\max} = 0,8 \text{ d}^{-1}$ $K_{Glc} = 0,05 \text{ g/L}$ $K_{Lac} = 1,25 \text{ g/L}$
Equação de Bree e colaboradores	$\mu = \mu_{\max} \frac{Gln}{K_{Gln} + Gln} \frac{K_{Amon}}{K_{Amon} + Amon} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac} + Lac}$	$\mu_{\max} = 3 \text{ d}^{-1}$ $K_{Gln} = 0,8 \text{ mM}$ $K_{Amon} = 1,05 \text{ mM}$
Equação de Miller e colaboradores	$\mu = \mu_{\max} \frac{Glc}{K_{Glc} + Glc} \frac{Gln}{K_{Gln} + Gln} \times \frac{K_{Amon}}{K_{Amon} + Amon} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac} + Lac}$	$\mu_{\max} = 1,5 \text{ d}^{-1}$ $K_{Glc} = 0,15 \text{ mM}$ $K_{Gln} = 0,5 \text{ mM}$ $K_{Amon} = 20 \text{ mM}$ $K_{Lac} = 140 \text{ mM}$

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 um suporte 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 por cisalhamento às células. Condições ambientais homogêneas e bem controladas e o fornecimento de ar enriquecido com CO₂ devem ser promovidos. Se as células forem aderentes, o sistema deve apresentar material de suporte com uma 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 uma cultura homogênea em reatores 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 fiquem adequados ao cultivo de células aderentes, como no caso de imobilização das células em microcarreadores. Projetos de biorreatores do tipo tanque agitado para células animais incluem o uso de fermentadores 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).

A Figura 3.3 mostra perfis cinéticos típicos de variação da concentração de nutrientes, células e produtos tipicamente observados no cultivo de células de mamíferos

em biorreatores operando de diferentes modos. Perfis distintos dos aqui apresentados podem ser obtidos, dependendo das características de associação da formação do produto ao crescimento celular.

A seleção da geometria e do modo de operação do biorreator, desta forma, depende das características de crescimento apresentadas pelas células, sendo que, normalmente, a abordagem é feita caso a caso.

O escalonamento do cultivo de células animais é mais facilmente realizado para culturas livres 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 que um vaso reativo de um litro de capacidade, por exemplo, pode ser considerado como conceitualmente similar a um biorreator de 1000 L, ou seja, o fator de aumento de escala não é muito elevado.

3.4. Escalonamento de Culturas de Células de Mamíferos

Quando grandes quantidades de células são necessárias, se a cultura se desenvolver na forma suspensa, é preciso aumentar o tamanho do reator. Normalmente, não é suficiente escalonar proporcionalmente um frasco de cultura particular. Com o aumento das dimensões, outras modificações no sistema devem ser efetuadas, para que não se verifique o comprometimento das condições de transferência de massa, homogeneidade e cisalhamento.

Uma agitação adequada deve ser realizada de maneira que haja a formação de uma mistura homogênea, a manutenção das células em suspensão e a otimização das transferências de massa e calor entre as diferentes fases do sistema. A geração de uma maior turbulência ocasiona uma mistura mais eficiente; contudo, deve haver um compromisso entre estes dois parâmetros para que as células não sejam danificadas por uma alta tensão de cisalhamento (Freshney, 1989).

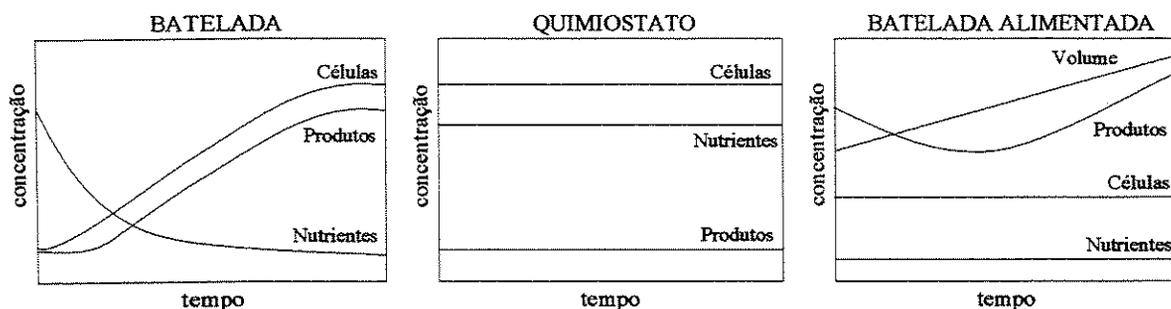


Figura 3.3: Perfis cinéticos da variação da concentração de nutrientes, células e produtos em função do tempo em biorreatores operando em modo batelada, quimiostato e batelada alimentada.

3.4.1. Meios e Nutrientes

Os nutrientes presentes ou adicionados a um meio de cultura são suficientes apenas para um certo número de células, e tornam-se escassos ao longo do cultivo. Isto é principalmente notado em cultivos em grande escala, onde geralmente a concentração celular é maior e o tempo de cultivo, mais longo. Ao se tornarem escassos, nutrientes alternativos são metabolizados pelas células, mas a taxa de crescimento celular é sempre reduzida. Para que isso não aconteça, é necessário manter a cultura com alguma alimentação adicional, com a realização de trocas de meio completas ou parciais ou por perfusão.

O soro é uma importante fonte de nutrientes mas, além disso, tem um efeito protetor físico e biológico contra danos celulares, que ocorrem principalmente com a agitação e a transferência de oxigênio. A proteção é maior com o aumento da concentração de soro, estabilizando-se, em geral, quando esta é superior a 10% em volume. O efeito físico está associado à redução da fluidez da membrana plasmática, aumentando a resistência das células ao cisalhamento (Chisti, 2000).

3.4.2. Tamponamento do Meio de Cultura

O sistema normal de tamponamento em meios de cultura de células de mamíferos é o sistema bicarbonato- CO_2 , análogo ao do sangue. Este é um sistema tamponante fraco e, para o cultivo em pequena escala, requer a incubação com CO_2 para que a concentração

deste gás no espaço vazio do frasco esteja em equilíbrio com a concentração no meio, prevenindo sua perda do meio de cultura. Um melhor tamponamento e estabilidade de pH são possíveis através do uso de um tampão zwitteriônico, tal como HEPES (entre 10 e 20 mM), em adição ou substituição ao bicarbonato (Freshney, 1989)

Ainda para o cultivo em pequena escala, o volume vazio em um frasco de cultura fechado é importante porque, em estágios iniciais do cultivo, 5% de CO₂ são necessários para manter um pH estável. Contudo, quando as células crescem e geram CO₂, ocorre um aumento da concentração deste gás no espaço vazio, evitando a difusão de CO₂ do meio. O resultado é um aumento na concentração de NaHCO₃, o que produz um excesso de íons H⁺ no meio e uma queda no pH. Para que isso não ocorra, um volume vazio dez vezes maior que o volume de meio é requerido para culturas em recipientes fechados.

Porém, ao aumentar a escala de uma cultura, a manutenção deste espaço torna-se inviável, e o volume vazio e a área superficial da cultura diminuem em relação ao volume de meio. Assim, os problemas de redução de pH ocorrem mais cedo no ciclo da cultura, pois um número maior de células implica em uma maior produção de ácido lático e CO₂, e este não é removido prontamente, sendo necessárias freqüentes trocas de meio ou um sistema de controle de pH.

3.4.3. Oxigênio

O escalonamento de culturas de células animais é muito dependente de um fornecimento de oxigênio adequado para que não haja dano celular. Entretanto, a solubilidade do oxigênio no meio de cultura é relativamente baixa.

A aeração deve ser realizada de maneira suave e pode ser feita por um ou por uma combinação dos seguintes métodos: aeração superficial, borbulhamento de gás, difusão por membranas, perfusão do meio, aumento da pressão parcial de O₂ e aumento da pressão atmosférica.

Em culturas estáticas aeradas superficialmente, um volume vazio dez vezes maior que o volume de meio é necessário para um fornecimento adequado de oxigênio em sistemas fechados. Já em culturas agitadas com aeração superficial, a transferência de oxigênio é dependente da taxa de agitação e da geometria do impelidor. Nos casos de

aeração superficial, a relação entre a profundidade do meio e o diâmetro do reator não deve exceder 2:1 no escalonamento do sistema, já que a quantidade de oxigênio transferida para o meio depende da área superficial da cultura. Entretanto, apenas a aeração superficial pode não ser suficiente para suprir o meio com concentrações adequadas de CO₂.

O borbulhamento de gás é um meio eficiente para a transferência de oxigênio para o meio de cultura. Contudo, este procedimento pode causar danos às células animais em diferentes proporções, uma vez que as linhagens celulares diferem em sua sensibilidade à aeração. Em meios livres de bolhas, células de camundongos são mais sensíveis à turbulência que células humanas e de insetos. Contudo, em biorreatores aerados, hibridomas de camundongos geralmente são mais robustos que células de insetos (Chisti, 2000). Em todos os casos, normalmente verifica-se que bolhas pequenas (diâmetros menores que 2 mm) são mais danosas às células que bolhas maiores (diâmetros de cerca de 10 mm), devido ao efeito da maior energia superficial nas bolhas pequenas sobre a membrana celular. Além disso, as bolhas grandes têm interfaces mais móveis e, como elas sobem mais rápido, carregam menos células em suas superfícies. As bolhas maiores também não permanecem na superfície como uma espuma estável que retém células.

Contudo, o efeito do tamanho da bolha no dano celular não é o mesmo para todos os tipos de células, e este é também afetado diretamente pela taxa de aeração. Embora a agitação mecânica sob condições típicas de cultura não danifique células suspensas na ausência de aeração, danos associados a esta podem ser aumentados pela agitação com impelidores, especialmente se os impelidores romperem as bolhas de gás (Chisti, 2000). Este efeito danoso pode ser minimizado pelo uso de bolhas grandes (que têm energia superficial menor que as pequenas), pelo uso de uma taxa gasosa menor ou pela adição de agentes protetores.

Uma boa transferência de oxigênio pode também ser obtida através de tubos de silicone. Contudo, este método é dispendioso e inconveniente, pois o comprimento do tubo para que a concentração de oxigênio seja adequada deve ser muito grande.

No sistema de perfusão, a aeração é efetuada pela retirada contínua do meio de cultura e por sua passagem através de uma câmara de oxigenação, antes de ser retornado ao compartimento onde estão as células. Este método tem muitas vantagens se o meio for convenientemente separado das células. O borbulhamento de oxigênio na câmara deve ser

feito vigorosamente para assegurar sua saturação no meio. Outras adições, tal como hidróxido de sódio para o controle do pH, podem ser feitas na câmara, pois a adição direta na cultura pode danificar as células.

A concentração de oxigênio dissolvido pode ser aumentada pelo aumento da pressão parcial de O₂ e também pelo aumento da pressão atmosférica, que aumenta a solubilidade do oxigênio e sua taxa de difusão. Estes métodos devem ser empregados apenas quando a cultura está bem avançada, pois, caso contrário, efeitos de toxicidade por oxigênio podem ocorrer.

Vários métodos têm sido utilizados para reduzir os danos às células associados à ruptura das bolhas. Um destes é a adição de agentes protetores, como o Pluronic F68.

O Pluronic F68 tem massa molecular de 8.358 Da e uma 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 (Chisti, 2000). A Figura 3.4 ilustra a estrutura química deste composto.

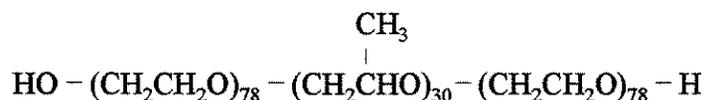


Figura 3.4: Estrutura química do Pluronic F68.

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 estabilizando-se 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 (Chisti, 2000).

Nas culturas aeradas, a presença do Pluronic F68 minimiza a ligação das células às bolhas, diminuindo os danos celulares que ocorrem quando aquelas são carreadas até a superfície. Outros mecanismos propostos também incluem a estabilização da interface gás-líquido 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, onde o dano celular ocorre devido aos vórtices formados, e a suplementação com Pluronic F68 reduz a tendência das células aderirem à nova superfície.

O efeito protetor deste surfatante pode também estar relacionado à sua associação bioquímica à membrana celular, proporcionando sua estabilização. Experimentos mostraram que a viabilidade de hibridomas não foi afetada com aumentos na intensidade da agitação. 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 (Chisti, 2000).

3.5. Aspectos Relevantes Relativos à Produção e à Aplicação de Interleucina-2

Muitas interações críticas entre as células do sistema imune são controladas por mediadores solúveis chamados citocinas e, dentre elas, a interleucina-2. As citocinas são grupos de proteínas intercelulares sinalizadoras que regulam não apenas respostas imunes e inflamatórias sistêmicas e locais, mas também a cicatrização de feridas, a hematopoiese, e muitos outros processos biológicos (Stites e col., 1994). Com a aplicação da tecnologia do DNA recombinante na indústria biotecnológica, é crescente o número de citocinas disponíveis para avaliação clínica (Mire-Sluis, 1999).

Mais de 100 citocinas estruturalmente e geneticamente diferentes foram identificadas até hoje. A maioria são peptídeos ou glicoproteínas com massas moleculares entre 6 e 60 kDa, e são produzidas em resposta a antígenos. Na fase de ativação da resposta imune, as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação dos linfócitos, e nas fases efetoras da imunidade inata e adaptativa, ativam diferentes células efetoras para eliminar estes antígenos (Abbas e col., 2000). Suas atividades geralmente sobrepõem-se consideravelmente, sendo que uma citocina pode induzir a secreção de outras, produzindo uma cascata de efeitos biológicos. Estas moléculas possuem potencial terapêutico em várias doenças, mas a síntese e a secreção anormal de citocinas pode causar diversas desordens patológicas (Mire-Sluis e Thorpe, 1998).

Diferentemente dos hormônios endócrinos, as citocinas não são produzidas por glândulas especializadas, mas por uma variedade de tecidos diferentes e células individuais. As citocinas produzidas por linfócitos são também conhecidas como linfocinas, enquanto que aquelas produzidas por monócitos ou macrófagos são chamadas monocinas. Estes compostos são extremamente potentes, agindo em concentrações de 10^{-10} a 10^{-15} M. Apenas algumas citocinas estão normalmente presentes em quantidades detectáveis no sangue e são capazes de influenciar células-alvo distantes. A maioria age apenas localmente sobre distâncias bastante curtas, tanto de maneira parácrina (sobre células adjacentes) quanto de maneira autócrina (sobre a atividade da própria célula).

3.5.1. Interleucina-2 Humana

A molécula de interleucina-2 humana é um polipeptídeo de massa molecular na faixa de 14 a 17 kDa, com 153 aminoácidos. Ela pode ser glicosilada em vários graus para produzir espécies com alta massa molecular, embora estes grupos não sejam necessários para sua função. Sua seqüência de aminoácidos não tem similaridade à de qualquer outra citocina conhecida, mas sua estrutura tridimensional é parecida com a da interleucina-4 (IL-4) e do fator de estimulação de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF). A IL-2 é uma proteína globular composta de 4 α -hélices que estão arranjadas formando faces planares hidrofílicas ao redor de um centro muito hidrofóbico. Esta configuração é mantida por uma única ligação dissulfeto entre cadeias, que é essencial para sua atividade biológica. Linfócitos T em estado latente não sintetizam ou secretam IL-2, mas podem ser induzidos a ambos através de combinações apropriadas de antígenos e fatores co-estimulatórios ou da exposição a mitógenos. Estudos de subtipos isolados de células T indicam que a produção de IL-2 induzida por antígenos ocorre principalmente em células T_H1 . Contudo, linfócitos CD8 e algumas células NK também podem ser induzidas a secretar IL-2 sob certas condições. A síntese e a liberação de IL-2 é transiente, com o pico de secreção ocorrendo cerca de 8 a 12 horas após a ativação (Abbas e col., 2000). Uma vez que a IL-2 tem uma meia-vida muito curta na circulação, ela age apenas sobre a célula que a secreta ou sobre células da vizinhança imediata (Stites e col., 1994).

A IL-2 é responsável pela proliferação das células antígeno-específicas. Com a exposição destas células à IL-2, várias proteínas celulares são ativadas, estimulando a

transição da fase G₁ para a fase S do ciclo celular. A IL-2 também promove a sobrevivência das células pela indução da proteína anti-apoptótica Bcl-2. A principal ação da IL-2 é autócrina, mas ela pode estimular a proliferação de algumas células adjacentes, funcionando como um fator de crescimento parácrino. Além de estimular o crescimento das células T, a IL-2 aumenta a produção de outras citocinas, tais como interferon- γ (IFN- γ) e IL-4.

A interleucina-2 promove também a proliferação e a diferenciação de outras células do sistema imune. Ela estimula o crescimento e aumenta a função citolítica das células NK, e age sobre as células B como fator de crescimento e como um estímulo para síntese de anticorpos.

Em decorrência da aplicação de IL-2 na terapia de diversas doenças, o estudo de sua produção *in vitro* tem significativa relevância tecnológica. A IL-2 utilizada na terapia humana é obtida geralmente de células T e B tumorais humanas, de alguns fungos modificados, e, principalmente, de *Escherichia coli* recombinante. Entretanto, a toxicidade desta citocina e outros efeitos colaterais decorrentes de sua administração ainda estão em estudo. Tais estudos envolvem, em suas etapas iniciais, modelos animais, onde se destacam os ensaios com camundongos. A IL-2 produzida neste trabalho poderia ser utilizada para a realização destes testes, já que a linhagem celular utilizada para sua produção, a EL-4, é uma linhagem de camundongo.

3.5.2. Interleucina-2 de Camundongo

A interleucina-2 de camundongo é uma glicoproteína com 169 aminoácidos, sendo cerca de 60% homóloga à humana (R & D Systems, 2000). Tem massa molecular na faixa de 30 a 35 kDa e é heterogênea em seu ponto isoelétrico (Paetkau e col., 1985). Enquanto a IL-2 humana é ativa sobre células de camundongos, a IL-2 murina é específica e não tem ação sobre células humanas.

Os linfócitos T e linhagens de células linfóides tumorais são fontes de IL-2 murina. Em ambos os tipos de células, é necessária uma estimulação para produzir quantidades significantes desta glicoproteína. A produção a partir de linfócitos T normais depende da ação de um mitogene e da presença de interleucina-1 (IL-1) produzida por macrófagos ou

de promotores como o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). As linhagens tumorais de células linfóides têm sido bastante utilizadas na caracterização da IL-2 e do seu papel na resposta imune.

Uma linhagem utilizada para a produção de quantidades apreciáveis de IL-2 murina e várias outras linfocinas é a EL-4. Esta linhagem foi primeiramente isolada por Farrar e colaboradores a partir de células de linfoma do timo de camundongos (Farrar e col., 1980), e tem sido muito utilizada como modelo de célula T pois produz IL-2, IL-4, interleucina-5 (IL-5) e interleucina-6 (IL-6) após estimulação com PMA (Ouyang e col., 1996).

3.5.3. Produção de Interleucina-2 por Células Animais em Cultivo

A interleucina-2 é secretada em pequenas quantidades pelas células T ativadas, o que torna esta fonte pouco adequada em termos de produzir quantidades significativas desta interleucina (Walsh e Headon, 1994). Diversos grupos abordaram em seus estudos a produção de IL-2 através do cultivo de algumas linhagens de células animais, empregando diferentes tipos de agentes de estimulação da formação desta citocina. Dentre os principais agentes de estimulação da produção de IL-2, destacam-se o forbol-12-miristato-13-acetato e a concanavalina A.

Um dos agentes mais largamente utilizados é o PMA. Este composto foi originalmente isolado a partir de óleo de sementes de *Croton tiglium* em 1931, e tem sido estudado devido a seu papel na promoção da formação de tumores em mamíferos. Evidências mostram que as células possuem um sítio receptor específico para o PMA, e a interação deste composto com proteínas da membrana causa uma alteração nas funções normais desta (Evans, 1986).

Segundo Farrar e colaboradores (1980), a estimulação da produção de IL-2 pelas células EL-4 deve-se à atuação do PMA sobre seu ciclo celular, e existe uma hipótese para esse mecanismo de ação. Alguns dados mostram que o PMA previne a entrada das células EL-4 na fase S e que o grau em que este composto retarda essa entrada é diretamente proporcional à quantidade de IL-2 produzida. Assim, a fase G₁ pode representar a fase do ciclo celular durante a qual a produção do fator é máxima. Outro conjunto de dados relevantes ao mecanismo de ação do PMA é a observação que as células EL-4 que se proliferam têm receptores para IL-2 e que o PMA inibe a ligação da IL-2 ao receptor.

Todos estes dados são consistentes com a observação de que as células EL-4 produzem a IL-2 na fase G₁ e utilizam na fase S seu próprio fator de crescimento. Assim, pode-se propor que um acúmulo significativo de fator de crescimento no sobrenadante da cultura de células EL-4 ocorre apenas depois que o PMA aumenta a produção através da manutenção das células na fase G₁ e da inibição da perda do fator pela prevenção da ligação do fator com o receptor. A estrutura química do PMA está apresentada na Figura 3.5.

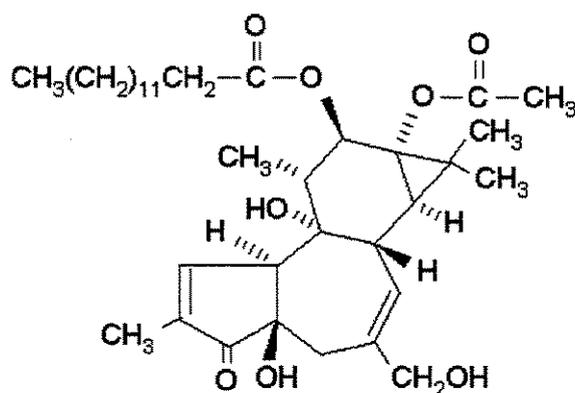


Figura 3.5: Estrutura química do forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).

A ativação das células T também tem sido estudada através de mitógenos como as lectinas, proteínas derivadas de plantas e bactérias e capazes de se ligar a carboidratos. Uma das lectinas bastante utilizada é a concanavalina A, que é obtida da mamona e é mitogênica para linfócitos T humanos e murinos. O mecanismo pelo qual este composto ativa as células T é através da sua ligação a moléculas de superfície envolvidas na ativação, como o TCR e a CD2 (Roitt e col., 1999).

Vários compostos, como succinato de vitamina E, vomitoxina e cicloheximida, quando empregados em conjunto com o PMA, são capazes de promover o aumento da expressão de produtos dos linfócitos T. O succinato de vitamina E é um derivado natural da vitamina E, e tem a habilidade de inibir a proliferação de várias linhagens de células tumorais, dependendo de sua concentração (Yu e col., 1996). Sob a ação da vomitoxina e da cicloheximida, as células EL-4 superexpressam os genes de diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-6), mesmo em concentrações que inibem a síntese protéica (Dong e col., 1994). A

vomitoxina parece induzir a superexpressão de IL-2 tanto ao nível de mRNA como de proteína, pelo menos em parte, devido a mecanismos pós-transcricionais (Li e col., 1997).

Em 1980, Farrar e colaboradores estudaram a produção de interleucina-2 a partir da linhagem celular não aderente EL-4, derivada de linfoblastos de camundongo. Esta linhagem celular foi cultivada em meio RPMI-1640 com ou sem 1% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas por 40 horas na presença ou na ausência de 10 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Comparada com um sobrenadante padrão de uma cultura de células de baço estimulada com Concanavalina A (Con A), ao qual foi atribuído um valor arbitrário de 100 unidades de IL-2 por mL, este sobrenadante da cultura de EL-4 estimulada com PMA continha 5462,4 unidades de IL-2 por mL. As células não estimuladas não produziram IL-2. A cultura sem SFB também produziu quantidades de IL-2 comparáveis àquela com soro quando estimulada com PMA. A interleucina-2 produzida apresentou massa molecular de 30 kDa e ponto isoelétrico entre 3,8 e 4,4, sendo bioquímica e biologicamente similar à interleucina-2 murina produzida pelas células de baço de camundongos.

Interleucina-2 foi obtida a partir de células de baço de camundongos por Fuller-Farrar e colaboradores, em 1981. O cultivo foi feito na presença de Concanavalina A em meio mínimo essencial de Hanks contendo 1 a 2% de SFB e na ausência de soro. Além disso, PMA foi adicionado em várias concentrações (0,01 a 1000 ng/mL) à cultura na presença ou na ausência de Con A. Verificou-se que a produção de IL-2 induzida por Con A pode ser aumentada de 5 a 10 vezes na presença de PMA e que a atividade específica de IL-2 em sobrenadantes de culturas livres de soro induzidas por Con A e PMA foi 23 vezes maior que aquela obtida de culturas contendo soro e PMA. Porém, a adição do PMA resultou em um aumento considerável da heterogeneidade da massa molecular da molécula de IL-2, o que é uma grande desvantagem para a purificação deste composto.

A habilidade das células EL-4 produzirem interleucina-2 através da exposição ao PMA e à Con A também foi estudada por Lasek e colaboradores em 1989. O cultivo *in vitro* foi realizado em meio RPMI-1640 contendo 1 ou 10% de SFB, e na presença dos indutores PMA e Con A em concentrações de 0 a 20 ng/mL e 0 a 20 µg/mL, respectivamente. As células EL-4 foram cultivadas por 24 horas na presença dos indutores. Após este período, o meio de cultura foi coletado e substituído por meio fresco sem a

presença de PMA e Con A, e as células foram incubadas por mais 24 horas. A retirada dos estimulantes foi realizada para que estes não interferissem nos ensaios imunocitotóxicos que seriam realizados. Nas faixas estudadas, a produção de IL-2 foi maior na presença de 10% de SFB do que quando apenas 1% de SFB estava presente. Por outro lado, Farrar e colaboradores (1980) observaram uma eficiente estimulação desta linhagem celular com o PMA em meio contendo apenas 1% de SFB. Segundo Lasek e colaboradores (1989), estas diferenças poderiam ser explicadas pelos diferentes clones de EL-4 utilizados. A maior atividade de IL-2 obtida foi de 756 U/mL em meio contendo 10% de SFB, 20 ng/mL de PMA e 5,0 µg/mL de Con A. A produção de IL-2 deveu-se principalmente à estimulação com o PMA, já que a adição de Con A de forma isolada teve efeito desprezível, e seu uso em conjunto com o PMA resultou em efeito sinérgico para apenas algumas culturas. Na maioria dos ensaios, concentrações de Con A acima de 2,5 µg/mL apresentaram pouco ou nenhum aumento na produção de IL-2.

Kratje e Wagner (1992) utilizaram a linhagem celular BHK21 pSVIL2 geneticamente modificada para a produção de interleucina-2 humana. O cultivo foi feito em biorreator de leito fluidizado com as células imobilizadas em microcarreadores porosos de vidro. Os ensaios foram realizados com diferentes formulações de meios de cultura. A imobilização das células foi bastante efetiva, pois a densidade celular final atingida foi de $3,8 \times 10^8$ células/mL de volume interno da partícula, valor correspondente ao empacotamento máximo para estas células. A taxa de produção máxima de interleucina foi de 0,75 mg/L por dia e 15,8 mg de IL-2 foram produzidos em 78 dias de cultivo. Um cultivo em reator de tanque agitado foi realizado para comparação com os resultados obtidos neste experimento. A taxa máxima de produção de IL-2 obtida foi de 3,5 mg/L por dia, valor cinco vezes maior que a obtida no experimento com reator de leito fluidizado. A menor taxa de produção obtida neste experimento pode estar relacionada à alta densidade celular, dificultando o transporte de nutrientes e metabólitos tóxicos.

Dong e colaboradores, em 1994, cultivaram células EL-4 em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino por intervalos de 2 e 8 dias com ou sem a adição de 10 ng/mL de PMA, a várias concentrações de vomitoxina (VT) e cicloheximida (CHX). Esta linhagem foi utilizada como um modelo de célula T para investigar os efeitos *in vitro* da VT sobre a produção de interleucina. A produção de IL-2 foi desprezível quando a cultura

não foi estimulada com PMA. Nas culturas estimuladas, a produção de IL-2 variou de acordo com as concentrações de VT e CHX. Com a adição de vomitoxina, a maior concentração de IL-2 foi de 460 U/mL e foi obtida com a adição de 50 ng/mL de VT num cultivo de 2 dias e com a adição de 100 ng/mL de VT para 8 dias de cultivo. A maior produção de IL-2 para o cultivo com ciclohiximida foi de 1179 U/mL e foi obtida com a adição de 50 ng/mL de CHX.

O cultivo de células EL-4 para a produção de interleucina-2 também foi estudado por Yu e colaboradores em 1996. Verificou-se neste estudo que a adição de PMA e de succinato de vitamina E induziram a expressão de interleucina-2 por esta linhagem celular. A adição de 0,1 µg/mL de succinato de vitamina E e de uma concentração sub-ótima de PMA (0,2 ng/mL) resultaram em uma atividade de 7 U/mL de IL-2. As culturas onde não houve adição de nenhum destes compostos ou onde apenas 0,2 ng/mL de PMA foi adicionado não produziram IL-2.

Em 1999, Boulougouris e colaboradores estudaram o cultivo de linfócitos T humanos para a produção de interleucina-2. As células foram estimuladas com PMA e com o ligante natural CD80. Como resultado, obteve-se uma baixa estimulação da produção de interleucina-2, concluindo que, para esta linhagem celular, o PMA não resultou em um bom efeito.

Dentre todos os indutores localizados na literatura, um dos mais efetivos e mais utilizados é o PMA. Sua utilização deve ser investigada, pois, como visto, o mesmo efeito não é observado para todas as linhagens celulares produtoras de interleucina-2. O estudo de seu efeito em conjunto com a Con A também é de relevância, bem como a tentativa de eliminar a adição de soro fetal bovino no meio de cultura.

A maior parte dos estudos encontrados na literatura foi realizada verificando-se efeitos antagônicos e sinérgicos, com a alteração de no máximo três variáveis independentes a cada vez. Com a utilização da estratégia de planejamento fatorial é possível trabalhar com um maior número de variáveis simultaneamente, e analisar não apenas o efeito de cada variável de forma isolada, mas também os efeitos de interação entre elas.

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

A metodologia de planejamento fatorial foi introduzida por Box na década de 1950 (Barros Neto e col., 1995), 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. Este planejamento é denominado planejamento fatorial completo 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 são não-significativas estatisticamente e descartá-las na realização de um planejamento fatorial completo (Barros Neto e col., 1995).

O planejamento experimental permite também a proposição de modelos que correlacionam as variáveis independentes com as variáveis resposta e a construção de superfícies de resposta para a determinação das faixas ótimas de operação. Os modelos são propostos com base em uma análise de variância (ANOVA).

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 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 dispendido 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.

A técnica de planejamento experimental, então, 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 de mamíferos 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 altos rendimento, produtividade, pureza e qualidade com menores custos.

Nos trabalhos encontrados sobre a produção de IL-2 a partir de células de mamíferos, os estudos foram realizados somente de maneira univariável. A linhagem EL-4 poderia então ser empregada para a avaliação da estratégia de planejamento fatorial na otimização da composição de meios de cultura, já que é bastante utilizada como modelo produtor de citocinas.

Capítulo IV

Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagem Celular

A linhagem de células EL-4, proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC), foi obtida do banco particular do Prof. Dr. João Santana da Silva, do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade Federal de São Paulo a um número de passagens desconhecido, e foram mantidas no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação (Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas) coordenado pela Prof^ª. Dr^ª. Wirla M. S. C. Tamashiro.

4.1.2. Componentes do Meio de Cultura e Outros Reagentes

O meio de cultura RPMI-1640 foi preparado conforme orientação do fabricante, com a adição de 2,0 g/L de bicarbonato de sódio (Merck & Co., Inc., EUA) e 15 mM de HEPES (Sigma-Aldrich Corp., EUA). O meio continha em sua formulação 2,0 g/L de D-glicose.

Outros reagentes utilizados foram L-glutamina, forbol-12-miristato-13-acetato, concanavalina A tipo IV-S, Pluronic F68, gentamicina e piruvato de sódio, todos da Sigma-Aldrich Corp. (EUA), soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e dimetilsulfóxido (Merck & Co., Inc., EUA). Para a detecção da interleucina-2 utilizou-se o kit enzimático M2000 Mouse IL-2 Quantikine M (R&D Systems, EUA).

4.2. Métodos

4.2.1. Manutenção e Propagação da Linhagem Celular

A propagação desta linhagem foi feita em frascos de cultura tipo T-25 (Corning Inc. Life Sciences, EUA) com meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Corp., EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich Corp., EUA), em estufa umidificada (95% de umidade relativa) a 37°C e com 5% de CO₂. Após o crescimento, as culturas foram transferidas para tubos cônicos estéreis (Corning Inc. Life Sciences, EUA) e centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. O *pellet* obtido foi ressuscitado em meio de congelamento RPMI-1640 com 10% de SFB e 10% de DMSO (Merck & Co., Inc., EUA) para a obtenção de uma suspensão contendo de 1,0 a 2,0 x 10⁶ células por mililitro. As amostras foram então transferidas para frascos de congelamento, que foram armazenados inicialmente em um freezer a -80°C e depois em um reservatório de criopreservação contendo nitrogênio líquido.

Cada lote de ensaios para o estudo da produção de IL-2 era iniciado a partir de uma amostra da cultura congelada.

Na preparação do inóculo, os repiques eram realizados quando as células ocupavam cerca de 60 a 80% da área do frasco de cultura. Quando o número de células necessário para a realização dos experimentos era obtido, o volume de suspensão celular era transferido para tubos cônicos estéreis (Corning Inc. Life Sciences, EUA) e centrifugado por 15 minutos a 1500 rpm para a retirada do meio de cultura. O *pellet* obtido era então lavado com meio RPMI-1640 sem soro e ressuscitado em meio RPMI-1640 para a obtenção de uma suspensão contendo a concentração de células viáveis necessária.

4.2.2. Avaliação do Crescimento Celular na Ausência do Indutor de Interleucina-2

Inicialmente, foram realizados ensaios de caracterização da cultura de células EL-4, determinando-se, por exemplo, a duração da fase lag de crescimento, a taxa específica máxima de crescimento celular, o início e a duração da fase de crescimento estacionário. Nestes ensaios foi empregado o meio de cultura comumente utilizado para a propagação destas células, RPMI-1640 suplementado com 1 ou 10% (v/v) de soro fetal bovino e com

50 µg/mL de gentamicina, na ausência de indutores de produção de IL-2. Diferentes concentrações de inóculo ($0,25$ a $1,0 \times 10^6$ células/mL) foram testadas e os cultivos foram realizados em frascos T-25 (Corning Inc. Life Sciences, EUA) em estufa umidificada (Lab-Line) a 37°C e com 5% de CO₂. Tais ensaios possibilitaram a comparação dos valores dos parâmetros cinéticos determinados a dados da literatura, facilitando a análise da adequação dos métodos experimentais selecionados.

4.2.3. Avaliação Preliminar da Cinética de Crescimento Celular

Com a finalidade de obter dados preliminares que nos possibilitasse estimar o período mais adequado para a coleta dos pontos experimentais relativos aos estudos envolvendo planejamentos fatoriais, realizou-se um ensaio onde a produção de IL-2 e o crescimento celular foram monitorados durante 70 horas.

As células foram inoculadas com uma concentração de $4,5 \times 10^5$ células por mL e cultivadas em placas de poliestireno de 6 poços (Costar) em estufa com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂ a 37°C. O meio utilizado foi o RPMI-1640 contendo 505 ng/mL de PMA, 5% (v/v) de SFB, 0,2% (m/v) de Pluronic F68 e 0,3 g/L de L-glutamina, condição considerada como possivelmente intermediária às que se empregaria no decorrer do estudo.

4.2.4. Estudo das Variáveis Relevantes na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular

Para a avaliação da influência da composição do meio de cultura, em termos do crescimento celular e da formação de interleucina-2, alguns fatores foram considerados, dentre eles a adaptação das células a uma menor quantidade de soro fetal bovino. Os efeitos das seguintes variáveis foram estudados: concentração de L-glutamina, concentração de PMA, concentração de Pluronic F68 e percentual de soro fetal bovino, além da concentração celular do inóculo.

A estratégia de planejamento fatorial foi utilizada para a verificação das variáveis de maior efeito na produção de IL-2 e na viabilidade celular. Os níveis de variação para as variáveis independentes foram propostos de acordo com a análise de literatura pertinente. O experimento foi realizado em meio RPMI-1640 contendo 50 µg/mL de gentamicina com

variações na concentração de L-glutamina de 0,3 a 0,6 g/L, de PMA de 10 a 100 ng/mL (Farrar e col., 1980), de Pluronic F68 de 0 a 0,2% (m/v) (Chattopadhyay e col., 1995) e de SFB de 0 a 10% (v/v) (Dong e col., 1994). A concentração celular inicial variou de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^6$ células/mL.

Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 6 poços (Costar), e estas foram incubadas em estufa umidificada a 37°C e com 5% de CO₂. O volume de trabalho em cada poço foi de 2,5 mL, e as variáveis resposta foram avaliadas 40 horas após a inoculação celular. Devido ao grande número de variáveis a serem estudadas, foi efetuado um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} para se determinar as variáveis com efeitos mais relevantes, com base no cálculo dos valores dos contrastes, descartando-se as demais em ensaios posteriores. Tais ensaios possibilitaram também o ajuste das concentrações dos compostos em estudo nos ensaios subsequentes.

Os ensaios relativos ao nível zero ou ponto central foram realizados em triplicata para possibilitar a estimativa do erro experimental associado aos testes. Os dados obtidos foram tratados no programa computacional Statistica (versão 5.0).

4.2.5. Estudo das Variáveis Concentração de PMA e de SFB na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular

Os efeitos das variáveis que se mostraram mais relevantes segundo os ensaios descritos no item anterior foram mais detalhadamente estudados segundo um planejamento fatorial completo do tipo 2^2 com 4 pontos centrais e 4 pontos axiais, já que as variáveis que mostraram ter maior efeito sobre as variáveis resposta foram a concentração de PMA e a percentagem de soro fetal bovino. A faixa de variação para a concentração de PMA foi de 10 a 1000 ng/mL e o percentual de SFB de 0 a 10% (v/v). A concentração do inóculo foi mantida no nível mais alto ($1,0 \times 10^6$ células/mL), a concentração de glutamina foi de 0,3g/L e o percentual de Pluronic F68 foi de 0,2% (m/v).

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas anteriormente, em placas de poliestireno de 6 poços (Costar) com 2,5 mL de meio inoculado por poço, e mantidos por 40 horas em estufa umidificada a 37°C e com 5% de CO₂.

Foram realizados quatro ensaios relativos ao ponto central para a estimativa do erro experimental associado aos testes. Os dados obtidos foram tratados pelo programa Statistica (versão 5.0).

4.2.6. Estudo do Efeito da Adição de Concanavalina A em conjunto com PMA na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular

Para avaliar se a concanavalina A e o PMA possuem efeitos sinérgicos na indução da produção de interleucina-2 pela linhagem de células EL-4 utilizada, montou-se um planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais e 6 pontos axiais, onde a influência das variáveis concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a concentração de IL-2 e a viabilidade celular foi estudada. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas anteriormente, em placas de poliestireno de 6 poços (Costar) com 2,5 mL de meio inoculados por poço, sendo as placas mantidas por 40 horas em estufa umidificada a 37°C e com 5% de CO₂.

As faixas de concentração foram de 0 a 2,5 µg/mL de Concanavalina A, de 500 a 2000 ng/mL de PMA e de 0 a 3% (v/v) de SFB. A concentração de inóculo foi de $1,0 \times 10^6$ células/mL, a de glutamina 0,3 g/L e o percentual de Pluronic F68 de 0,2% (m/v), valores estes mantidos constantes em todos os experimentos deste ensaio.

Foram realizadas quatro réplicas relativas ao ponto central para a estimativa do erro experimental associado aos testes. Os dados obtidos foram tratados pelo programa Statistica (versão 5.0).

4.2.7. Avaliação do Efeito da Ampliação da Faixa de Concentração de PMA sobre a Produção de Interleucina-2

Com o intuito de obter uma composição de meio de cultura onde a produção de IL-2 fosse maximizada, realizou-se um ensaio onde diferentes concentrações de PMA foram empregadas (500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL) e não foi realizada adição de SFB. As concentrações de inóculo e glutamina foram de $1,0 \times 10^6$ cel/mL e 0,3 g/L, respectivamente. O percentual de Pluronic F68 foi mantido em 0,2%. O experimento foi realizado em placas

de cultura de células com 6 poços (Costar) com 2,5 mL de meio inoculado por poço, e estas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO₂ por 40 horas.

4.2.8. Ampliação da Escala de Cultivo

Nesta etapa do trabalho foram realizados dois ensaios para avaliar o comportamento celular e a produção de interleucina-2 em uma fermentação prolongada sob agitação, visando a obtenção de dados preliminares para a produção em maior escala. Nestes ensaios, realizados no IPT, na Divisão de Química/Agrupamento de Biotecnologia, a composição do meio de cultura foi aquela encontrada como mais adequada nos ensaios realizados, ou seja, meio RPMI-1640 contendo 856 ng/mL de PMA, 1,5% (v/v) de SFB e 0,2% (m/v) de Pluronic F68. A glutamina já está presente neste meio de cultura na concentração de 0,3 g/L e a concentração de inóculo utilizada foi de $1,0 \times 10^6$ células viáveis por mililitro.

O primeiro experimento foi realizado em frasco *spinner* de 250 mL (μ -Bellco Biotech. Inc., modelo 1965), e este foi mantido a 37°C em estufa não-umidificada (Forma Scientific, modelo 3110), com 5% de CO₂ por cerca de 70 horas. A agitação (120 rpm) era efetuada através de uma plataforma magnética (Bell multi-stir, Bellco Glass Inc.). Neste experimento, as concentrações de glicose, ácido láctico e amônio foram periodicamente monitoradas. O segundo ensaio foi realizado nas mesmas condições, mas em uma estufa umidificada (Forma Scientific, modelo 3110), por cerca de 44 horas. Neste último ensaio, a concentração de aminoácidos foi monitorada, além das concentrações de glicose, ácido láctico e amônio.

Para a comparação dos resultados obtidos nestes experimentos, realizou-se um ensaio estático com as mesmas concentrações de PMA (856 ng/mL), SFB (1,5%), Pluronic F68 (0,2%), de glutamina (0,3 g/L) e de inóculo ($1,0 \times 10^6$ cel/mL). Para isso, utilizou-se placas de cultura de 6 poços (Costar), que foram mantidas em estufa umidificada a 37°C e com 5% de CO₂ por cerca de 60 horas. Apenas as concentrações de IL-2 e de células foram monitoradas.

Os experimentos realizados durante este estudo estão resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resumo dos experimentos realizados.

Experimento	Variáveis estudadas e suas concentrações	Sistema de cultivo
Caracterização preliminar da cultura	SFB: 1 ou 10% Inóculo: 0,25 a $1,0 \times 10^6$ cel/mL	Garrafas T-25
Avaliação do período de coleta das amostras	Inóculo: $4,5 \times 10^5$ cel/mL; SFB: 5%; PMA: 505 ng/mL; Pluronic F68: 0,2%; GLN: 0,3 g/L	Placas de cultura de 6 poços
Planejamento fracionário 2^{5-1}	PMA: 10 a 100 ng/mL SFB: 0 a 10% GLN: 0,3 a 0,6 g/L Pluronic F68: 0 a 0,2% Inóculo: 0,1 a $1,0 \times 10^6$ cel/mL	Placas de cultura de 6 poços
Planejamento completo 2^2	PMA: 10 a 1000 ng/mL SFB: 0 a 10% GLN: 0,3 g/L; Pluronic F68: 0,2%; Inóculo: $1,0 \times 10^6$ cel/mL	Placas de cultura de 6 poços
Planejamento completo 2^3	PMA: 500 a 2000 ng/mL Con A: 0 a 2,5 μ g/mL SFB: 0 a 3%; GLN: 0,3 g/L; Pluronic F68: 0,2%; Inóculo: $1,0 \times 10^6$ cel/mL	Placas de cultura de 6 poços
Ampliação da faixa de PMA	PMA: 500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL SFB: 0%; GLN: 0,3 g/L; Pluronic F68: 0,2%; Inóculo: $1,0 \times 10^6$ cel/mL	Placas de cultura de 6 poços
Ampliação da escala de cultivo	PMA: 856 ng/mL; SFB: 1,5%; GLN: 0,3 g/L; Pluronic F68: 0,2%; Inóculo: $1,0 \times 10^6$ cel/mL	Frasco <i>Spinner</i> e placas de cultura de 6 poços

4.2.9. Metodologia Analítica

4.2.9.1. Acompanhamento do Crescimento e Viabilidade Celular

A morfologia e a concentração celular foram monitoradas através de microscopia ótica, empregando-se um hemocitômetro.

O número de células mortas foi estimado pelo método de exclusão de azul de Trypan (Freshney, 1994), fundamentado no fato que células mortas absorvem o corante devido a falhas na membrana celular, enquanto células vivas impedem sua entrada, permanecendo descoloridas. As células foram observadas no microscópio dentro de no máximo 3 minutos após a adição do corante.

4.2.9.2. Determinação da Atividade de Interleucina-2

A detecção de interleucina foi realizada por teste do tipo ELISA sanduíche utilizando placas de 96 poços, empregando o kit enzimático M2000 Mouse IL-2 Quantikine M, da R&D Systems, conforme o protocolo do fabricante. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços recobertas com um anticorpo policlonal específico para interleucina-2 murina natural ou recombinante. Primeiramente adicionou-se 50 μL por poço de uma solução protéica tamponada, que atua como diluente, e, em seguida, padrões, controles e amostras foram colocados também a um volume de 50 μL por poço. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, a placa foi lavada cinco vezes com um tampão de lavagem e 100 μL /poço de uma solução contendo anticorpo contra IL-2 de camundongo conjugado com peroxidase foram adicionados. A placa foi incubada novamente por duas horas em temperatura ambiente e, após este período, a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se 100 μL de solução de substrato (peróxido de hidrogênio e o cromóforo tetrametilbenzidina) em cada poço. Depois de 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, interrompeu-se a reação com 100 μL de solução de ácido clorídrico diluído. As concentrações foram então determinadas em uma leitora de placas ELISA (Labsystems Multiskan MS) a 450 nm com correção no comprimento de onda de 540 nm.

Sempre que possível, as amostras eram analisadas imediatamente após o cultivo celular, depois de sua centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos para a remoção das células. Quando a análise imediata não era possível, as amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, com a adição de soro fetal bovino para criopreservação.

4.2.9.3. Determinação da Concentração de Glicose

Os ensaios para a dosagem de glicose, ácido láctico, amônio e aminoácidos foram realizados no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), conforme procedimentos implantados pela Dr^a. Elisabeth Augusto e sua equipe.

Para a determinação da concentração de glicose, as amostras passaram primeiramente por um processo de desproteínização. Para isso, foram tratadas com uma solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA a 240 g/L), na proporção de 1:1 (amostra/TCA). As amostras foram então centrifugadas a 10000 rpm e 4°C, por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi 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, com 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 SC 1011P e por uma coluna Shodex SC 1011. A temperatura do forno da coluna era de 72°C e a fase móvel era constituída de uma solução de EDTA 0,01N (0,6 mL/min).

4.2.9.4. Determinação da Concentração de Ácido Láctico

Para a dosagem de ácido láctico, utilizou-se também a cromatografia líquida e o mesmo tratamento de desproteínização das amostras descrito anteriormente. Um equipamento da WATERS com bomba modelo 600 E, detector de índice de refração modelo 410, injetor Rheodyne modelo 7161, 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 SH 1011P e por uma coluna Shodex SH 1011P. A temperatura do forno da coluna era de 55°C e a fase móvel utilizada foi uma solução de H₂SO₄ 0,01N, a uma vazão de 1,0 mL/min.

4.2.9.5. 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).

4.2.9.6. Determinação da Concentração de Aminoácidos

Para a determinação da concentração de aminoácidos presentes no meio de cultura foi empregada a reação com ninidrina precedida pela técnica de cromatografia de troca iônica. Utilizou-se a coluna Pickering Laboratories High Efficiency - Lithium 3x150mm a 40°C, e uma vazão da fase móvel de 0,3 mL/min com o seguinte gradiente de pH: 0-12 min, isocrático com 100% de reagente Li280; 12-48 min, gradiente linear até 65% de Li280 e 35% de Li750; 48-90 min, gradiente linear até 100% de Li750; 90-95 min, isocrático com 100% de Li750; 95-120, gradiente linear até 94% de Li750 e 6% de Regenerante RG003; 120-130 min, degrau para 100% Li280. Após a cromatografia, a reação foi feita com o reagente de ninidrina a 0,4 mL/min e 130°C em reator Pickering Laboratories PCX 3100, utilizando-se o detector de absorvância Dionex AD20 e um comprimento de onda de 570 nm.

Capítulo V

Resultados e Discussão

5.1. Caracterização Preliminar da Cultura

Ensaio preliminares de crescimento celular em frascos do tipo *erlenmeyer* e em incubadora, a 37°C, com agitação a 40 rpm, foram realizados para a linhagem celular EL-4. O cultivo em *shaker* não apresentou bons resultados, mesmo com a adição de 550 mg/L piruvato de sódio, que faz com que as células aumentem sua produção de CO₂, deixando-as independentes de CO₂ e de bicarbonato (Freshney, 1994). O fato de não se verificar crescimento celular satisfatório fez com que os ensaios fossem realizados em garrafas tipo T-25 e placas de cultura.

5.1.1. Efeito da Concentração de Inóculo no Crescimento Celular

Uma vez que a literatura é relativamente escassa no tocante ao detalhamento dos parâmetros cinéticos relativos ao cultivo da linhagem EL-4, efetuaram-se ensaios preliminares para a verificação do efeito da concentração do inóculo no crescimento celular. Tal estudo indicaria também os períodos requeridos para a obtenção de inóculos a serem utilizados ao longo do trabalho, a partir das amostras preservadas em nitrogênio líquido.

Os resultados destes ensaios, apresentados na Figura 5.1, possibilitaram a seleção da faixa de concentração celular e do período mais adequado para a interrupção do cultivo visando a dosagem de IL-2 produzida quando da avaliação dos efeitos dos diferentes componentes do meio de cultura.

A duração da fase lag do crescimento para esta linhagem foi de cerca de 10 horas. As velocidades específicas máximas de crescimento foram, em média, de $0,0342 \pm 0,0026 \text{ h}^{-1}$

nos diferentes tipos de cultivo feitos, o que permitiu calcular o tempo de duplicação desta linhagem celular ocorrendo em aproximadamente 20,3 horas.

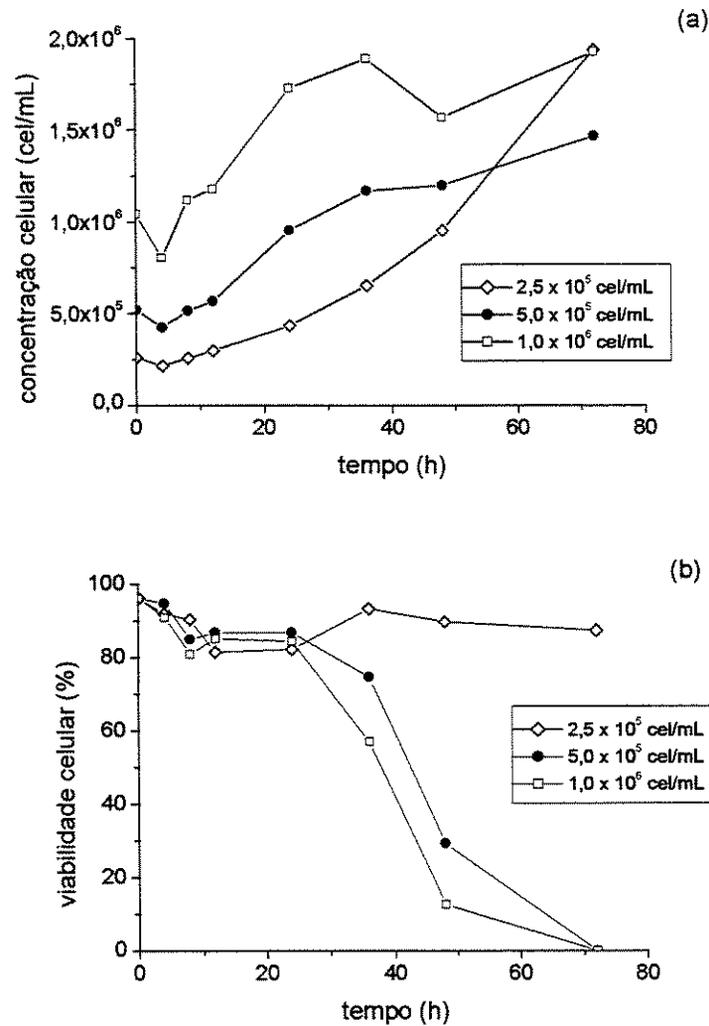


Figura 5.1: Efeito da concentração de inóculo celular no crescimento (a) e na viabilidade (b) das células EL-4. As células foram inoculadas em frascos T-25 com 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂.

Observa-se que, em 48 horas de cultivo, as culturas com inóculos iniciais de $5,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ cel/mL praticamente atingiram a fase estacionária. Para estes casos, a

viabilidade celular manteve-se acima de 80% durante as primeiras 24 horas, diminuindo rapidamente após este período. As concentrações celulares máximas obtidas para estas densidades de inóculos foram de $1,47 \times 10^6$ cel/mL e $1,93 \times 10^6$ cel/mL, respectivamente. Já a cultura em que o inóculo inicial era de $2,5 \times 10^5$ cel/mL não atingiu a fase estacionária em 72 horas.

A partir destes resultados, considerou-se que as melhores densidades celulares iniciais para a realização de experimentos posteriores são de $5,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ cel/mL, já que as etapas mais significativas do ciclo celular ocorrem em 48 horas. Do ponto de vista de viabilidade celular, cultivos com duração superior a 40 horas poderiam ser problemáticos, pois altas quantidades de proteases intracelulares poderiam ser liberadas por morte celular, podendo atacar o produto de interesse IL-2.

5.1.2. Influência da Concentração de Soro Fetal Bovino no Crescimento Celular

Como o soro fetal bovino é um componente de alto custo no meio de cultura e causa dificuldades nos processos de separação e purificação do produto obtido, ensaios de crescimento celular foram realizados para se verificar, ao longo do tempo, as diferenças no crescimento da linhagem celular EL-4 em meios de cultura com 1 e 10% de soro. Dados da literatura já mostravam que o cultivo desta linhagem com suplementação de apenas 1% de soro fetal bovino era possível (Farrar e col., 1980). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.2.

A redução da porcentagem de soro fetal bovino não apresentou efeito apreciável sobre o crescimento e a viabilidade desta linhagem celular, como observa-se na Figura 5.2. As curvas de concentração e viabilidade celular apresentaram pequenas diferenças. Estes resultados corroboram estudos anteriores indicando que o cultivo das células EL-4 pode ser realizado a uma baixa concentração de soro, reduzindo custos na produção da interleucina e dificuldades nos processos de separação e purificação.

A velocidade específica máxima de crescimento celular foi de $0,0431 \text{ h}^{-1}$ para a cultura com 1% de soro fetal bovino, muito próxima daquela onde o meio de cultura foi suplementado com 10% SFB.

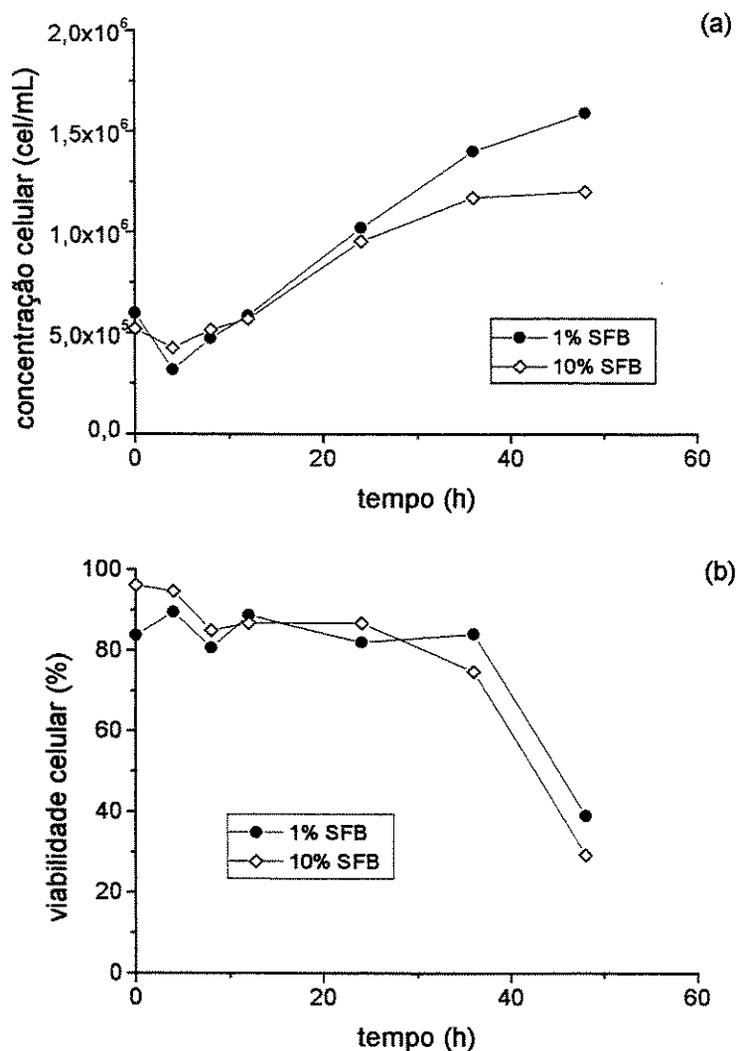


Figura 5.2: Influência da concentração de SFB no crescimento (a) e na viabilidade (b) celular. As células EL-4 foram inoculadas a uma concentração de $5,0 \times 10^5$ cel/mL em frascos T-25 com meio de cultura RPMI-1640. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 .

5.1.3. Ensaio Cinético para Avaliação do Período de Coleta das Amostras

Uma vez que o custo da análise de interleucina-2 estimado para cada amostra (em duplicata) é de cerca de R\$ 40,00, não se considerando o custo da obtenção da curva padrão (de cerca de R\$ 360,00), requerida para cada ensaio, e tendo-se em vista que, com um kit de detecção pode-se efetuar apenas três ensaios independentes devido à limitação das

quantidades dos padrões, não seria possível, para todos os estudos envolvendo planejamentos fatoriais, monitorar o comportamento cinético da produção da glicoproteína de interesse.

A literatura indica que a produção de interleucina-2 pelas células EL-4 pode ser feita em 24 horas (Lasek e col., 1989), 40 horas (Farrar e col., 1980), 48 horas (Yu e col., 1996) e de 2 a 8 dias (Dong e col., 1994).

Com estas informações em mãos, efetuou-se um ensaio exploratório para se avaliar o tempo mais indicado para a interrupção dos ensaios dos planejamentos fatoriais que seriam realizados de modo a se obter as amostras para dosagem de IL-2. Optou-se por utilizar condições experimentais aproximadamente intermediárias às que seriam empregadas, ou seja, 505 ng/mL de PMA, 5% (v/v) de SFB, 0,2% (m/v) de Pluronic F68 e 0,3 g/L de glutamina. Os resultados estão apresentados na Figura 5.3.

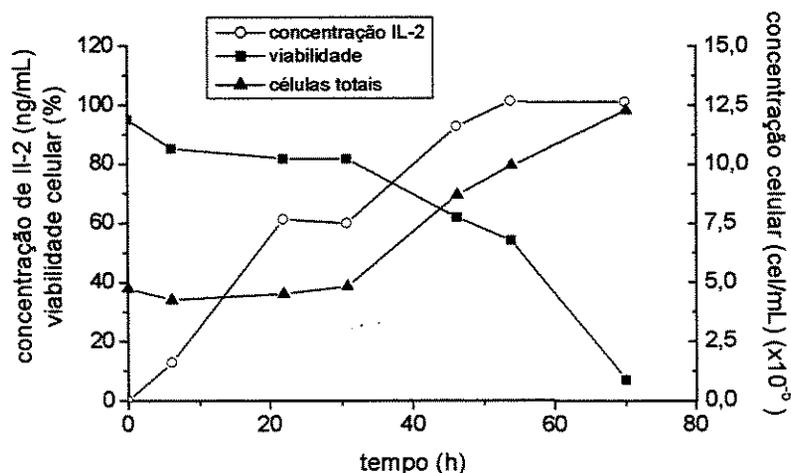


Figura 5.3: Ensaio cinético com monitoramento da concentração de IL-2 produzida e concentração de células viáveis. Os ensaios foram realizados em placas de cultura com 6 poços, e estas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO₂. As células foram inoculadas a uma concentração de $4,5 \times 10^5$ cel/mL e a concentração de PMA era de 505 ng/mL.

Observa-se que a formação do produto de interesse está parcialmente associada ao crescimento celular, iniciando-se na fase lag. A duração da fase lag neste meio de cultura contendo PMA foi de cerca de 30 horas, bem maior quando comparada às culturas feitas na sua ausência (Figura 5.1). Esta maior duração da fase lag pode estar relacionada à manutenção das células na fase G₁ pelo PMA. Já a maior produção de citocina observada antes da fase de crescimento celular está de acordo com o que ocorre *in vivo*, onde o pico de liberação de IL-2 pelas células T CD4⁺ ocorre cerca de 8 a 12 horas após a ativação da célula (Abbas e col., 2000).

Na fase log do crescimento celular, a produção de IL-2 esteve associada ao crescimento celular. A velocidade máxima de crescimento específica foi de 0,0161 h⁻¹, cerca de 50% menor que a obtida com o cultivo em meio livre de PMA.

Como mostra a Figura 5.3, até cerca de 30 horas a viabilidade celular manteve-se acima de 80%, reduzindo-se continuamente após este período. Apesar da redução de viabilidade celular e da ausência de inibidores de proteases no meio de cultura, foi possível detectar o aumento discreto das concentrações de IL-2 através dos ensaios imunoenzimáticos. Entretanto, sugere-se que a duração máxima do cultivo desta linhagem para a produção de IL-2 seja de 55 horas. Para a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com dados da literatura, a interrupção dos ensaios dos planejamentos fatoriais subsequentes foi, então, realizada 40 horas após a inoculação das células.

5.2. Efeitos das Concentrações de PMA, Pluronic F68, Soro Fetal Bovino, Inóculo e Glutamina

A influência das cinco variáveis (concentrações de PMA, Pluronic F68, soro fetal bovino, concentração inicial de células e glutamina) sobre a viabilidade celular e sobre a quantidade de interleucina-2 produzida foi estudada através de um planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹ com 3 pontos centrais. As variáveis e seus níveis estão apresentados na Tabela 5.1.

Analisando-se a Tabela 5.2, que mostra o planejamento fatorial fracionário efetuado e os resultados obtidos, verifica-se que a concentração de IL-2 obtida após 40 horas de cultivo variou de 0 a 98 ng/mL, o que mostra a importância do estudo da composição do meio de cultura para uma maior produção desta glicoproteína. As maiores concentrações de IL-2 foram obtidas quando a concentração do inóculo celular era de $1,0 \times 10^6$ cel/mL, com as células cultivadas na presença de 100 ng/mL de PMA e 10% de SFB. A viabilidade celular variou de 48 a 100%.

Tabela 5.1: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} .

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
PMA (ng/mL)	10	55	100
Pluronic F68 (% m/v)	0	0,1	0,2
SFB (% v/v)	0	5	10
Concentração celular (cel/mL)	$1,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$
Glutamina (g/L)	0,3	0,45	0,6

Através do programa computacional Statistica (versão 5.0), foram calculados os contrastes das variáveis independentes nas respostas. O limite de confiança adotado foi de 95%, ou seja, para que o efeito da variável independente sobre a variável resposta fosse estatisticamente significativo, o valor de *p*, obtido pela análise de variância, deveria ser menor que 0,05.

Como pode ser observado na Tabela 5.3, as variáveis que apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a concentração final de IL-2 foram o PMA, o soro fetal bovino e a concentração inicial de células. Como esperado, o aumento nas concentrações destas variáveis levou a um aumento da concentração de IL-2, já que o PMA é um indutor da produção de IL-2, o SFB contém nutrientes essenciais para o cultivo de células e a densidade inicial de células na cultura é um fator importante na obtenção de uma maior quantidade do produto de interesse. A adição de Pluronic F68 e de glutamina não resultou em alterações com significância estatística.

Tabela 5.2: Resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} efetuado nas condições descritas na Tabela 5.1.

Ensaio	PMA	Pluronic F68	SFB	Conc. celular	Glutamina	Concentração de IL-2 (ng/mL)	Viabilidade celular (%)
1	-1	-1	-1	-1	+1	0,10	100
2	+1	-1	-1	-1	-1	1,13	75
3	-1	+1	-1	-1	-1	3,64	77
4	+1	+1	-1	-1	+1	9,61	60
5	-1	-1	+1	-1	-1	6,75	75
6	+1	-1	+1	-1	+1	13,20	62
7	-1	+1	+1	-1	+1	12,62	68
8	+1	+1	+1	-1	-1	15,96	61
9	-1	-1	-1	+1	-1	0,00	63
10	+1	-1	-1	+1	+1	0,89	71
11	-1	+1	-1	+1	+1	3,08	69
12	+1	+1	-1	+1	-1	28,89	71
13	-1	-1	+1	+1	+1	27,39	62
14	+1	-1	+1	+1	-1	66,24	48
15	-1	+1	+1	+1	-1	11,88	69
16	+1	+1	+1	+1	+1	97,99	52
17	0	0	0	0	0	39,69	50
18	0	0	0	0	0	56,62	56
19	0	0	0	0	0	42,78	57

Três variáveis apresentaram efeitos negativos significativos sobre a viabilidade celular após 40 horas. Como observa-se na Tabela 5.4, o aumento da concentração de PMA, de soro fetal bovino e da concentração celular causaram decréscimos na viabilidade celular em torno de 10%. Como as células EL-4 utilizam a própria interleucina-2 produzida por elas como fator de crescimento, a diminuição da viabilidade celular causada pelo aumento da concentração de PMA está provavelmente relacionada à hipótese deste composto inibir a ligação da IL-2 a seu receptor ou prevenir a expressão deste. O aparente efeito negativo do soro fetal bovino na viabilidade celular pode ser atribuído ao longo tempo de cultivo, estando o meio de cultura provavelmente escasso em nutrientes e com

acúmulo de metabólitos tóxicos. Este composto não deveria diminuir a viabilidade das células, pois contém estimulantes que induzem o crescimento celular, o que faz dele um aditivo de grande relevância para a realização de um cultivo *in vitro*. A menor viabilidade verificada para as culturas inoculadas com maior concentração celular pode estar relacionada ao mais rápido consumo de nutrientes e conseguinte produção e acúmulo de metabólitos tóxicos.

Tabela 5.3: Contrastes obtidos para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento fracionário 2^{5-1} .

	Contraste (ng/mL)	Desvio Padrão	t(2)	p
Média*	23,08	2,07	11,16	0,00794
PMA (ng/mL)*	21,06	4,51	4,67	0,04291
Pluronic F68 (% m/v)	8,50	4,51	1,88	0,20018
SFB (% v/v)*	25,59	4,51	5,68	0,02967
Conc. celular (cel/mL)*	21,67	4,51	4,81	0,04066
Glutamina (g/L)	3,80	4,51	0,84	0,48817

*fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 5.4: Contrastes obtidos para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} .

	Contraste (%)	Desvio Padrão	t(2)	p
Média*	65,58	0,869	75,50	0,00018
PMA (ng/mL)*	-10,38	1,893	-5,48	0,03172
Pluronic F68 (% m/v)	-3,63	1,893	-1,91	0,19558
SFB (% v/v)*	-11,13	1,893	-5,88	0,02775
Conc. celular (cel/mL)*	-9,13	1,893	-4,82	0,04044
Glutamina (g/L)	0,63	1,893	0,33	0,77265

*fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Para efeito comparativo, os contrastes das variáveis independentes sobre todas as variáveis resposta analisadas podem ser simultaneamente visualizados na Figura 5.4. Analisando-se os resultados, observa-se que o Pluronic F68 não teve um grande efeito sobre a viabilidade celular e a produção de IL-2. Como este composto é um agente protetor contra o cisalhamento e sua adição provocou um discreto aumento na concentração de IL-2, sua concentração no meio de cultura foi mantida em 0,2% nos ensaios subsequentes. A variável concentração de glutamina também não apresentou uma grande influência, assim, sua concentração foi mantida em 0,3 g/L (concentração presente no meio de cultura RPMI-1640 já formulado), minimizando custos.

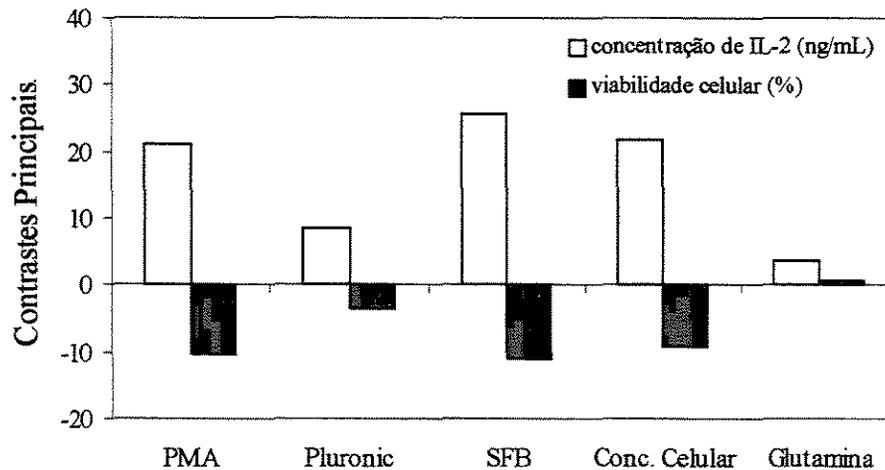


Figura 5.4: Contrastes das variáveis independentes sobre a concentração de IL-2 e a viabilidade celular obtidas com a realização do planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} descritos nas Tabelas 5.3 e 5.4.

Observando-se os efeitos da concentração celular inicial sobre a produção de IL-2, verifica-se que a quantidade de IL-2 produzida foi dependente da densidade celular no inóculo. Entretanto, a viabilidade celular diminuiu com a elevação da concentração de células inoculadas na cultura. Desta forma, o experimento subsequente foi feito de acordo com um planejamento fatorial completo, no qual a concentração de células no inóculo foi fixada em $1,0 \times 10^6$ cel/mL, visando a obtenção de maiores concentrações de IL-2. O

aumento da concentração de inóculo para além de $1,0 \times 10^6$ cel/mL não seria recomendável porque o processo de morte celular ocorreria num estágio inicial da cultura, já que haveria rápida escassez de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos.

Apesar do aumento da concentração de PMA ter ocasionado um decréscimo na viabilidade celular, como visto anteriormente, esta variável é de extrema relevância para uma maior produção de IL-2. Assim, nos estudos subsequentes, a faixa de concentração de PMA foi ampliada para 10 a 1000 ng/mL. Nesses ensaios, os efeitos sobre a viabilidade e a concentração celular foram mais detalhadamente acompanhados, já que também não é desejável que a viabilidade das células após 40 horas de cultivo apresente níveis muito baixos, pois desfavoreceria a produção de IL-2, além de produzir proteases que poderiam degradar o produto de interesse. A faixa de concentração de soro fetal bovino de 0 a 10% foi mantida, já que uma maior concentração de soro eleva o custo do meio de cultura.

5.3. Planejamento Experimental para Otimização da Composição do Meio de Cultura

A influência das variáveis concentrações de PMA e de soro fetal bovino sobre a concentração final de células e sobre a concentração de interleucina-2 produzida foi estudada através de um planejamento fatorial completo 2^2 com 4 pontos centrais e 4 pontos axiais. O planejamento com pontos axiais foi realizado para que a faixa de estudo fosse ampliada e um modelo quadrático pudesse ser obtido. As variáveis e seus níveis estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais.

Variáveis	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
PMA (ng/mL)	10	153,93	505	856,06	1000
SFB (% v/v)	0	1,45	5	8,55	10

As concentrações de Pluronic F68, de células e de glutamina foram mantidas em 0,2% (m/v), $1,0 \times 10^6$ cel/mL e 0,3 g/L, respectivamente. A Tabela 5.6 mostra o planejamento fatorial completo e os resultados obtidos com sua utilização.

Tabela 5.6: Planejamento fatorial completo 2^2 com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais.

Ensaio	PMA	SFB	Concentração de IL-2 (ng/mL)	Concentração celular total (cel/mL)	Viabilidade celular (%)	Produção específica de IL-2 (pg/célula)
1	-1	-1	123,83	$1,57 \times 10^6$	49,80	0,0789
2	+1	-1	162,25	$1,31 \times 10^6$	60,29	0,1242
3	-1	+1	75,44	$1,26 \times 10^6$	30,20	0,0598
4	+1	+1	94,68	$1,08 \times 10^6$	38,95	0,0881
5	-1,41	0	67,33	$1,54 \times 10^6$	49,39	0,0436
6	+1,41	0	134,41	$0,88 \times 10^6$	45,71	0,1536
7	0	-1,41	117,18	$1,22 \times 10^6$	52,31	0,0961
8	0	+1,41	81,92	$1,43 \times 10^6$	31,14	0,0575
9	0	0	106,62	$1,42 \times 10^6$	38,33	0,0751
10	0	0	107,27	$1,16 \times 10^6$	36,56	0,0923
11	0	0	110,67	$1,74 \times 10^6$	36,92	0,0635
12	0	0	100,79	$1,24 \times 10^6$	33,33	0,0814

Analisando-se a Tabela 5.6, verifica-se que, após 40 horas de cultivo, a maior concentração de IL-2 foi de cerca de 162 ng/mL, obtida com o ensaio 2, com uma concentração de PMA de 856 ng/mL e uma percentagem de soro de 1,45%. Já a menor concentração foi de 67 ng/mL, obtida com a concentração de PMA de 10 ng/mL e 5% de soro (ensaio 5). O valor médio das medidas do ponto central foi de $106,34 \pm 2,37$ ngIL-2/mL. A viabilidade celular variou de 30 a 60%, apresentando valor médio na condição central de $36,29 \pm 2,1\%$. Os ensaios relativos ao ponto central foram reprodutíveis, como indicam os baixos valores de desvio padrão. A produção específica variou de 0,0436 a 0,1536 pg/célula, sendo estes valores obtidos para concentrações de PMA de 10 e 1000 ng/mL, respectivamente, e 5% de soro fetal bovino.

5.3.1 Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Concentração de Interleucina-2

Os efeitos das variáveis independentes na resposta concentração final de interleucina-2 estão listados na Tabela 5.7. Observa-se que as variáveis PMA e o SFB (termos lineares) mostraram ter efeitos significativos a 95% de confiança sobre a concentração de IL-2. Um aumento da concentração de PMA de 10 para 1000 ng/mL leva a um aumento na concentração de IL-2 de cerca de 38 ng/mL. Já a concentração de soro mostrou ter um efeito negativo sobre a concentração final do produto alvo. Um aumento da concentração de SFB de 0 a 10% levou a um decréscimo na concentração de IL-2 de cerca de 42 ng/mL. No planejamento anterior, a concentração de soro produziu um efeito positivo sobre a concentração de IL-2. O termo de interação foi estatisticamente significativo a 90% de confiança, e apresentou um efeito negativo sobre a concentração final de IL-2. Os termos quadráticos não apresentaram efeitos significativos, como indica o teste p.

Tabela 5.7: Efeitos obtidos para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento completo 2^2 .

	Efeitos (ng/mL)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	106,30	2,05	51,83	0,00002
PMA (L)*	38,17	2,90	13,14	0,00095
PMA (Q)	1,52	3,26	0,47	0,67261
SFB (L)*	-41,54	2,90	-14,30	0,00074
SFB (Q)	0,19	3,26	0,06	0,95734
PMA (L) x SFB (L)**	-9,59	4,10	-2,34	0,10144

* fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

** fatores estatisticamente significativos a 89% de confiança

Como os termos de segunda ordem não apresentaram efeitos significativos sobre a produção de IL-2, verificou-se a possibilidade da proposição de um modelo de primeira ordem que descrevesse o processo de produção de IL-2 pelas células EL-4. Para isso,

eliminaram-se os ensaios relativos aos pontos axiais do planejamento. A Tabela 5.8 apresenta os coeficientes de regressão para este modelo.

Tabela 5.8: Coeficientes de regressão para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento completo 2^2 sem pontos axiais.

	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão
Média*	110,19	1,45
PMA (L)*	14,42	2,05
SFB (L)*	-28,99	2,05
PMA (L) x SFB (L)**	-4,79	2,05

* fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

** fator estatisticamente significativo a 89% de confiança

A Equação 5.1 relaciona a concentração de IL-2 em função das variáveis codificadas para um nível de confiança de 90%.

$$C_{IL-2} = 110,19 + 14,42 \cdot C_{PMA} - 28,99 \cdot C_{SFB} - 4,79 \cdot (C_{PMA} \cdot C_{SFB}) \quad (5.1)$$

A validade deste modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.9.

Comparando-se os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} , pode-se verificar se o modelo proposto é estatisticamente significativo e preditivo. Para isso, o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser no mínimo de quatro a cinco vezes maior que o valor de F_{tabelado} (Barros Neto e col., 1995).

Pela análise de variância verificou-se que $F_{\text{calculado}}$ é 8,05 vezes maior que F_{tabelado} (igual a 4,19), o que mostra que o modelo de primeira ordem obtido para a produção de IL-2 na faixa estudada é preditivo e estatisticamente significativo. Além disso, observa-se que 96,20% da variação é descrita pela regressão, ficando apenas 3,80% com os resíduos.

Tabela 5.9: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de IL-2 para o planejamento completo 2^2 sem pontos axiais.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	4284,72	3	1428,24	33,74
Resíduos	169,30	4	42,33	
Falta de Ajuste	118,83	1		
Erro Puro	50,47	3		
Total	4454,03	7		

$$F_{0,90;3;4} = 4,19$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 96,20$$

Na Tabela 5.10 observam-se os desvios dos valores de concentração de IL-2 preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais. Os erros obtidos ficaram na faixa de 0,43 a 9,33%, confirmando que o modelo é satisfatório para prever a produção de IL-2.

Tabela 5.10: Valores experimentais e preditos pelo modelo para a concentração de IL-2 para o planejamento completo 2^2 sem pontos axiais. Os efeitos das concentrações de SFB e PMA foram estudados nas faixas de 1,45 a 8,55% e de 153,93 e 856,06 ng/mL, respectivamente.

Ensaio	IL-2 experimental	IL-2 predita	Desvio (%)
1	123,83	119,97	3,12
2	162,25	158,39	2,38
3	75,44	71,58	5,12
4	94,68	90,82	4,08
9	106,62	110,19	3,35
10	107,27	110,19	2,72
11	110,67	110,19	0,43
12	100,79	110,19	9,33

A partir do modelo, construiu-se a superfície de resposta apresentada na Figura 5.5. Verifica-se que o aumento da concentração de PMA e a diminuição da percentagem de SFB

levam ao aumento da concentração de IL-2. Observa-se ainda que a concentração de IL-2 não atingiu um valor máximo, o que poderia ocorrer aumentando-se ainda mais a concentração de PMA.

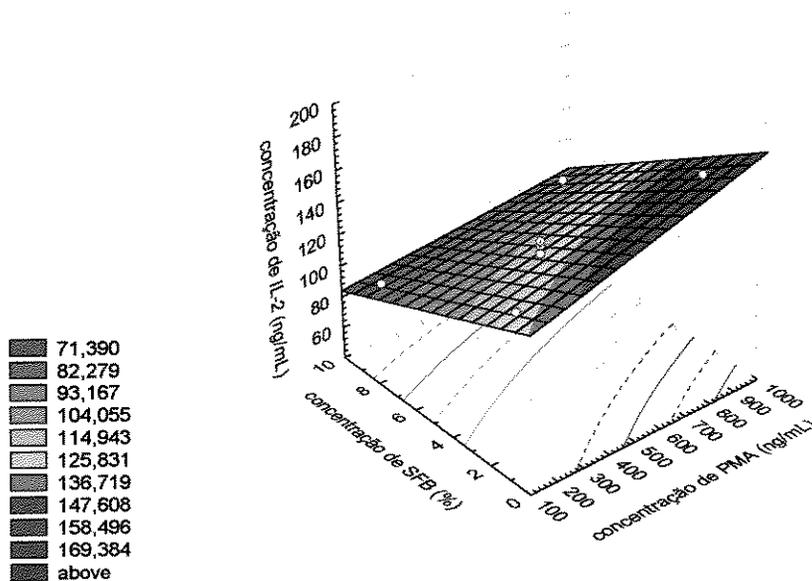


Figura 5.5: Superfície de resposta para a concentração de IL-2 obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 sem pontos axiais.

5.3.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Viabilidade Celular

No experimento relativo ao planejamento fatorial fracionário, a concentração de PMA apresentou um efeito negativo sobre a viabilidade celular, que não foi confirmado neste experimento, como pode ser observado na Tabela 5.11. Para a faixa de PMA estudada neste experimento, a análise dos efeitos dos termos lineares mostrou que na presença de maiores concentrações de PMA, a viabilidade celular após 40 horas de cultivo apresentou valores maiores, com um nível de 90% de confiança. Já o efeito da concentração de soro fetal mostrou-se novamente negativo, e esta observação pode ser resultante do fato da viabilidade celular em 40 horas apresentar valores muito baixos. Um aumento da concentração de SFB de 0 para 10% levou a um decréscimo de cerca de 18% na viabilidade. Quanto aos termos quadráticos, o teste p mostra que ambos têm significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5.11: Efeitos obtidos para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2².

	Efeitos (%)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	36,28	1,05	34,40	0,00005
PMA (L)**	3,52	1,49	2,36	0,09950
PMA (Q)*	11,40	1,67	6,81	0,00649
SFB (L)*	-17,75	1,49	-11,88	0,00128
SFB (Q)*	5,53	1,67	3,30	0,04560
PMA (L) x SFB (L)	-0,87	2,11	-0,41	0,70920

*fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

**fator estatisticamente significativo a 90% de confiança

Verificou-se a possibilidade da proposição de um modelo (Equação 5.2) que descrevesse a viabilidade celular em função das concentrações de PMA e SFB. Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 5.12.

$$Viabilidade = 36,28 + 1,76 \cdot C_{PMA} + 5,70 \cdot (C_{PMA})^2 - 8,87 \cdot C_{SFB} + 2,77 \cdot (C_{SFB})^2 \quad (5.2)$$

Tabela 5.12: Coeficientes de regressão para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento completo 2².

	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão
Média*	36,28	1,05
PMA (L)**	1,76	0,75
PMA (Q)*	5,70	0,84
SFB (L)*	-8,87	0,75
SFB (Q)*	2,77	0,84

*fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

**fator estatisticamente significativo a 90% de confiança

Através da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.13, verificou-se que a regressão é responsável por explicar cerca de 89% da variação total e que a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de 5,01, o que faz com que este modelo seja indicado para prever o comportamento da viabilidade celular nas faixas das variáveis estudadas.

Tabela 5.13: Análise de variância (ANOVA) para a viabilidade celular para o planejamento fatorial completo 2^2 .

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	876,88	4	219,22	14,82
Resíduos	103,53	7	14,79	
Falta de Ajuste	90,18	4		
Erro Puro	13,35	3		
Total	980,41	11		

$$F_{0,90;4;7} = 2,96$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 89,44$$

Os desvios dos valores de viabilidade celular preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais estão apresentados na Tabela 5.14. A faixa de erro obtida foi de 0,77 a 12,98%, mostrando que o modelo é adequado para descrever a viabilidade celular nas faixas de concentração avaliadas.

A partir do modelo obtido, construiu-se a superfície de resposta apresentada na Figura 5.6. Observa-se que o aumento da concentração de PMA e o decréscimo da concentração de SFB levam a um aumento na viabilidade celular.

5.3.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Concentração de Células Total

As variáveis estudadas neste planejamento não apresentaram efeitos significativos sobre a concentração de células total obtida após 40 horas de cultivo, conforme mostrado na Tabela 5.15. Isto pode estar relacionado à maior duração da fase lag devido à

manutenção das células na fase G_1 do crescimento celular pelo PMA. Logo, não foi adequada a proposição de um modelo que descrevesse o comportamento desta variável.

Tabela 5.14: Valores experimentais e preditos pelo modelo para a viabilidade celular para o planejamento completo 2^2 .

Ensaio	Viabilidade experimental	Viabilidade predita	Desvio (%)
1	49,80	51,86	4,14
2	60,29	55,38	8,14
3	30,20	34,12	12,98
4	38,95	37,64	3,36
5	49,39	45,13	8,62
6	45,71	50,09	9,59
7	52,31	54,29	3,79
8	31,14	29,28	5,97
9	38,33	36,28	5,35
10	36,56	36,28	0,77
11	36,92	36,28	1,73
12	33,33	36,28	8,85

5.3.4. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA e SFB sobre a Produção Específica

Já observando-se os efeitos obtidos para a produção específica em termos de células totais, ilustrados na Tabela 5.16, os efeitos principais das duas variáveis estudadas mostraram-se significativos a 95% confiança. No entanto, os efeitos foram contrários. O aumento da concentração de PMA levou a um aumento da produção específica (0,0573 pg/célula). Já o aumento da concentração de SFB acarretou um decréscimo de cerca de 0,0275 pg/célula na produção específica, o que pode estar associado ao efeito deste componente na redução da viabilidade celular ocorrida para os ensaios do planejamento fatorial completo.

A validade de um modelo para prever o comportamento da produção específica em função das variáveis PMA e SFB foi verificada com uma análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.17. A análise de variância mostrou que $F_{\text{calculado}}$ é cerca

de 5,92 vezes F_{tabelado} e que o modelo explica apenas 86,63% da variação. Portanto, o modelo não é satisfatório para prever a produção específica após 40 horas de cultivo.

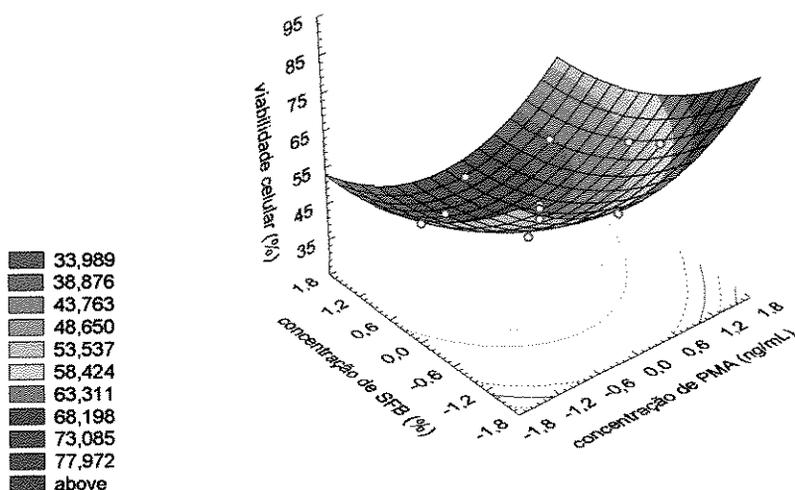


Figura 5.6: Superfície de resposta para a viabilidade celular obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 .

Tabela 5.15: Efeitos obtidos para a concentração de células total após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^2 .

	Efeitos (cel/mL)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	$1,39 \times 10^6$	$1,29 \cdot 10^5$	10,74	0,00172
PMA (L)	$-3,49 \times 10^5$	$1,83 \cdot 10^5$	-1,91	0,15279
PMA (Q)	$-1,63 \times 10^5$	$2,05 \cdot 10^5$	-0,79	0,48561
SFB (L)	$-6,19 \times 10^4$	$1,83 \cdot 10^5$	-0,34	0,75799
SFB (Q)	$-4,98 \times 10^4$	$2,05 \cdot 10^5$	-0,24	0,82409
PMA (L) x SFB (L)	$3,75 \times 10^4$	$2,59 \cdot 10^5$	0,14	0,89399

* fator estatisticamente significativo a 95% de confiança

Tabela 5.16: Efeitos obtidos para a produção específica após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2².

	Efeitos (pg/célula)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	0,0781	0,0060	12,97	0,00099
PMA (L)*	0,0573	0,0085	6,73	0,00671
PMA (Q)**	0,0206	0,0096	2,16	0,11972
SFB (L)*	-0,0275	0,0085	-3,23	0,04823
SFB (Q)	-0,0013	0,0096	-0,14	0,90101
PMA (L) x SFB (L)	-0,0085	0,0120	-0,70	0,53218

* fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

** fator estatisticamente significativo a 88% de confiança

Tabela 5.17: Análise de variância (ANOVA) para a produção específica para o planejamento fatorial completo 2².

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	0,008790	3	0,0029300	17,29
Resíduos	0,001356	8	0,0001659	
Falta de Ajuste	0,000921	5		
Erro Puro	0,000435	3		
Total	0,010146	11		

 $F_{0,90;3;8} = 2,92$ % variação explicada (R^2) = 86,63

Analisando-se os resultados obtidos para este planejamento experimental, verificou-se que a produção de IL-2 aumentou elevando-se a concentração de PMA e reduzindo-se a percentagem de SFB para valores menores que 1,45%. Observou-se também que a concentração de IL-2 pode ainda aumentar com uma concentração de PMA acima de 856 ng/mL. Já a viabilidade celular foi pouco afetada pelo aumento na concentração de PMA, diminuindo com a adição de soro, o que não era esperado, já que o soro normalmente estimula o crescimento celular.

O estudo foi então expandido para estas variáveis, incorporando também outro agente estimulador da produção de IL-2, a concanavalina A.

A comparação dos dados obtidos neste trabalho com dados da literatura não pode ser diretamente efetuada, pois geralmente a produção de IL-2 é medida em ensaios de atividade biológica, de acordo com o padrão internacional estabelecido pelo NIBSC/WHO (*National Institute for Biological Standards and Control/World Health Organization*), e referida como unidades de atividade por mililitro, e não apenas em nanogramas de IL-2 por mililitro, como nos imunoenaios aqui realizados. Neste estudo, 162 ng/mL de IL-2 foram obtidos no cultivo estático da EL-4, porém a atividade biológica da amostra não foi determinada.

5.4. Efeito da Adição de Concanavalina A e PMA na Produção de Interleucina-2 e no Crescimento Celular

No estudo realizado por Lasek e colaboradores (1989), a adição de Con A apresentou um discreto efeito sobre a produção de IL-2, sendo que concentrações de Con A acima de 2,5 µg/mL apresentaram pouco ou nenhum aumento na indução da expressão deste composto. Como a faixa de concentração de PMA utilizada neste trabalho é maior que aquela estudada por aquele grupo de pesquisa, incluiu-se também neste estudo a investigação do efeito da adição de concanavalina A na faixa de 0 a 2,5 µg/mL. Para isso, montou-se um planejamento fatorial completo 2³ com 4 pontos centrais e 6 pontos axiais, no qual a influência das variáveis concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a concentração de IL-2 e a viabilidade celular foi estudada.

As variáveis e seus níveis estão apresentados na Tabela 5.18. A faixa de concentração de PMA foi ampliada para 500 a 2000 ng/mL e a de percentual de SFB foi reduzida para 0 a 3%, já que ensaios anteriores onde os efeitos do soro fetal e do PMA foram avaliados indicaram que um aumento da concentração do indutor PMA poderia ocasionar uma maior produção de IL-2 e que o menor percentual de soro proporcionou maiores viabilidade celular e concentração de interleucina. Com base nas concentrações de

concanavalina A utilizadas por Lasek e colaboradores (1989), a faixa escolhida foi de 0 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5.18: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 4 pontos centrais.

Variáveis	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
PMA (ng/mL)	500	803,57	1250	1696,43	2000
Con A ($\mu\text{g/mL}$)	0	0,51	1,25	1,99	2,5
SFB (% v/v)	0	0,61	1,5	2,39	3

A Tabela 5.19 mostra o planejamento fatorial completo e os resultados obtidos com sua utilização. Analisando-se os resultados, verificou-se que não ocorreu uma grande variação nas concentrações de IL-2 obtidas para cada ensaio após 40 horas de cultivo, estando entre 45,4 e 94,6 ng/mL. A viabilidade celular variou de 10 a 37%, ficando abaixo daquela verificada para o ensaio onde avaliou-se apenas os efeitos das concentrações de PMA e SFB.

5.4.1. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a Concentração de Interleucina-2

Os efeitos das variáveis Con A, PMA e SFB sobre a concentração de IL-2 podem ser observados na Tabela 5.20. Verifica-se que a variação da concentração de PMA de 500 para 2000 ng/mL não apresentou efeito significativo sobre a produção de IL-2. Já incrementos nas concentrações de Con A e de SFB ocasionaram um pequeno aumento de, em média, 9,45 e 8,50 ng/mL na concentração de IL-2, respectivamente. Contudo, o efeito do PMA sobre a concentração de IL-2 obtido no ensaio anterior, onde apenas este indutor foi adicionado na faixa de 10 a 1000 ng/mL, foi maior que o verificado para este ensaio onde a Con A foi adicionada, mostrando que o PMA é melhor indutor da produção desta interleucina. Nenhum dos termos de interação apresentou efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança, mostrando também que estes indutores não têm efeitos

sinérgicos na produção de IL-2 por esta linhagem celular nas faixas de concentração testadas. A validade do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.21.

Tabela 5.19: Planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 4 pontos centrais.

Ensaio	PMA	Con A	SFB	Concentração de IL-2 (ng/mL)	Concentração celular total (cel/mL)	Viabilidade celular (%)	Produção específica (pg/célula)
1	-1	-1	-1	72,22	$1,31 \times 10^6$	17,62	0,0550
2	+1	-1	-1	66,78	$1,44 \times 10^6$	29,44	0,0463
3	-1	+1	-1	90,03	$1,40 \times 10^6$	13,39	0,0643
4	+1	+1	-1	83,14	$1,43 \times 10^6$	29,39	0,0583
5	-1	-1	+1	77,04	$1,56 \times 10^6$	19,28	0,0495
6	+1	-1	+1	74,24	$1,28 \times 10^6$	22,06	0,0582
7	-1	+1	+1	77,92	$1,71 \times 10^6$	21,90	0,0455
8	+1	+1	+1	79,83	$1,56 \times 10^6$	24,90	0,0513
9	-1,68	0	0	72,22	$1,51 \times 10^6$	10,37	0,0479
10	+1,68	0	0	76,40	$1,37 \times 10^6$	36,99	0,0558
11	0	-1,68	0	80,47	$1,51 \times 10^6$	19,83	0,0532
12	0	+1,68	0	94,63	$1,46 \times 10^6$	21,03	0,0650
13	0	0	-1,68	45,36	$0,95 \times 10^6$	30,26	0,0477
14	0	0	+1,68	81,74	$1,51 \times 10^6$	22,73	0,0540
15	0	0	0	76,27	$1,24 \times 10^6$	25,63	0,0613
16	0	0	0	81,74	$1,83 \times 10^6$	19,11	0,0446
17	0	0	0	87,86	$1,31 \times 10^6$	25,71	0,0669
18	0	0	0	77,04	$1,58 \times 10^6$	23,81	0,0489

A análise de variância mostrou que a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de 2,13 e que apenas 53,45% da variação pode ser explicada pela regressão (46,55% da variação é devido aos resíduos), mostrando que o modelo não é preditivo e significativo.

Tabela 5.20: Efeitos obtidos para a concentração de IL-2 após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^3 .

	Efeitos (ng/mL)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	80,58	2,66	30,27	0,0001
PMA (L)	-0,91	2,89	-0,31	0,7742
PMA (Q)	-3,30	3,00	-1,10	0,3520
CON A (L)*	9,45	2,89	3,27	0,0467
CON A (Q)	6,08	3,00	2,02	0,1360
SFB (L)*	8,50	2,89	2,94	0,0603
SFB (Q)*	-10,93	3,00	-3,64	0,0358
PMA (L) x CONA (L)	0,81	3,77	0,22	0,8435
PMA (L) x SFB (L)	2,86	3,77	0,76	0,5033
CONA (L) x SFB (L)	-6,92	3,77	-1,84	0,1637

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança

Tabela 5.21: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de IL-2 para o planejamento fatorial completo 2^3 .

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	992,66	3	330,89	5,36
Resíduos	864,69	14	61,76	
Falta de Ajuste	779,37	11		
Erro Puro	85,32	3		
Total	1857,36	17		

$$F_{0,90;3;14} = 2,52$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 53,45$$

5.4.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a Viabilidade Celular

Conforme ilustrado na Tabela 5.22, dentro de um limite de 90% de confiança, apenas o efeito principal da variável PMA e o efeito de interação entre PMA e SFB foram

estatisticamente significativos. O aumento da concentração de PMA levou a um aumento da viabilidade celular, enquanto o termo de interação apresentou um efeito negativo sobre esta variável.

Tabela 5.22: Efeitos obtidos para a viabilidade celular após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^3 .

	Efeitos (%)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	23,63	1,55	15,29	0,0006
PMA (L)*	11,48	1,68	6,85	0,0064
PMA (Q)	-0,48	1,74	-0,27	0,8012
CONA (L)	0,47	1,68	0,28	0,7983
CONA (Q)	-2,78	1,74	-1,59	0,2090
SFB (L)	-2,11	1,68	-1,26	0,2981
SFB (Q)	1,52	1,74	0,87	0,4487
PMA (L) x CONA (L)	1,10	2,19	0,50	0,6503
PMA (L) x SFB (L)*	-5,51	2,19	-2,52	0,0865
CONA (L) x SFB (L)	2,43	2,19	1,11	0,3472

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança

Uma análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.23, foi realizada para verificar se um modelo de segunda ordem poderia ser proposto para a viabilidade celular.

A análise de variância mostrou a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de 8,60, mas o percentual de variação explicado pelo modelo foi de apenas 75,6, o que faz com que o modelo não seja adequado para prever a viabilidade celular após 40 horas.

5.4.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a Concentração de Células Total

Conforme a Tabela 5.24, nenhuma das variáveis apresentou efeito significativo sobre a concentração de células total, o que não permitiu a proposição de um modelo.

Tabela 5.23: Análise de variância (ANOVA) para a viabilidade celular para o planejamento fatorial completo 2^3 .

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	510,02	2	255,01	23,21
Resíduos	164,81	15	10,99	
Falta de Ajuste	136,05	12		
Erro Puro	28,76	3		
Total	674,84	17		

$$F_{0,90;2;15} = 2,70$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 75,58$$

Tabela 5.24: Efeitos obtidos para a concentração de células total após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2^3 .

	Efeitos (cel/mL)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	$1,49 \times 10^6$	$1,34 \times 10^5$	11,10	0,0016
PMA (L)	$-7,51 \times 10^4$	$1,45 \times 10^5$	-0,52	0,6408
PMA (Q)	$-1,78 \times 10^3$	$1,51 \times 10^5$	-0,01	0,9913
CONA (L)	$6,04 \times 10^4$	$1,45 \times 10^5$	0,42	0,7056
CONA (Q)	$3,14 \times 10^4$	$1,51 \times 10^5$	0,21	0,8485
SFB (L)	$2,15 \times 10^5$	$1,45 \times 10^5$	1,48	0,2361
SFB (Q)	$-1,48 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$	-0,98	0,3996
PMA (L) x CONA (L)	$4,69 \times 10^3$	$1,90 \times 10^5$	0,02	0,9818
PMA (L) x SFB (L)	$-1,48 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$	-0,78	0,4909
CONA (L) x SFB (L)	$9,22 \times 10^4$	$1,90 \times 10^5$	0,49	0,6602

*fator estatisticamente significativo a 95% de confiança

5.4.4. Análise dos Efeitos das Concentrações de PMA, Con A e SFB sobre a Produção Específica de IL-2

Para a produção específica, as variáveis estudadas também não produziram efeitos estatisticamente significativos, como pode ser observado na Tabela 5.25.

Tabela 5.25: Efeitos obtidos para a produção específica após 40 horas para o planejamento fatorial completo 2³.

	Efeitos (pg/célula)	Desvio Padrão	t(3)	p
Média*	0,05547	0,00521	10,66	0,0018
PMA (L)	0,00191	0,00565	0,34	0,7576
PMA (Q)	-0,00266	0,00587	-0,45	0,6810
CONA (L)	0,00443	0,00565	0,78	0,4898
CONA (Q)	0,00245	0,00587	0,42	0,7050
SFB (L)	-0,00129	0,00565	-0,23	0,8336
SFB (Q)	-0,00336	0,00587	-0,57	0,6071
PMA (L) x CONA (L)	-0,00003	0,00737	0,00	0,9967
PMA (L) x SFB (L)	0,00731	0,00737	0,99	0,3944
CONA (L) x SFB (L)	-0,00808	0,00737	-1,10	0,3535

*fator estatisticamente significativo a 95% de confiança

Neste planejamento observou-se que as variáveis que mais influenciaram a produção de IL-2 foram a concentração de Con A e a percentagem de SFB. Apesar do aumento destas variáveis ocasionar uma maior produção de interleucina, as concentrações finais de IL-2 observadas nestes ensaios foram menores que aquelas obtidas nos ensaios anteriores onde a concanavalina A não estava presente, possivelmente devido à menor concentração de células viáveis, já que os valores obtidos para a viabilidade celular foram menores que os observados nos estudos anteriores.

5.5. Avaliação do Efeito da Ampliação da Faixa de Concentração de PMA sobre a Produção de Interleucina-2

Conforme verificou-se no ensaio segundo o planejamento fatorial completo onde variou-se as concentrações de PMA e SFB, um aumento da concentração de PMA para um valor acima de 856 ng/mL e a redução da percentagem de SFB poderiam ocasionar um

aumento da concentração de IL-2 para além de 162 ng/mL, valor obtido para uma concentração de PMA de 856 ng/mL e um percentual de SFB de 1,45%. Com base nestes resultados, realizou-se um ensaio onde o PMA foi utilizado nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL e não foi realizada a adição de SFB. As concentrações de inóculo e glutamina foram de $1,0 \times 10^6$ cel/mL e 0,3 g/L, respectivamente. O percentual de Pluronic F68 foi mantido em 0,2%. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.7.

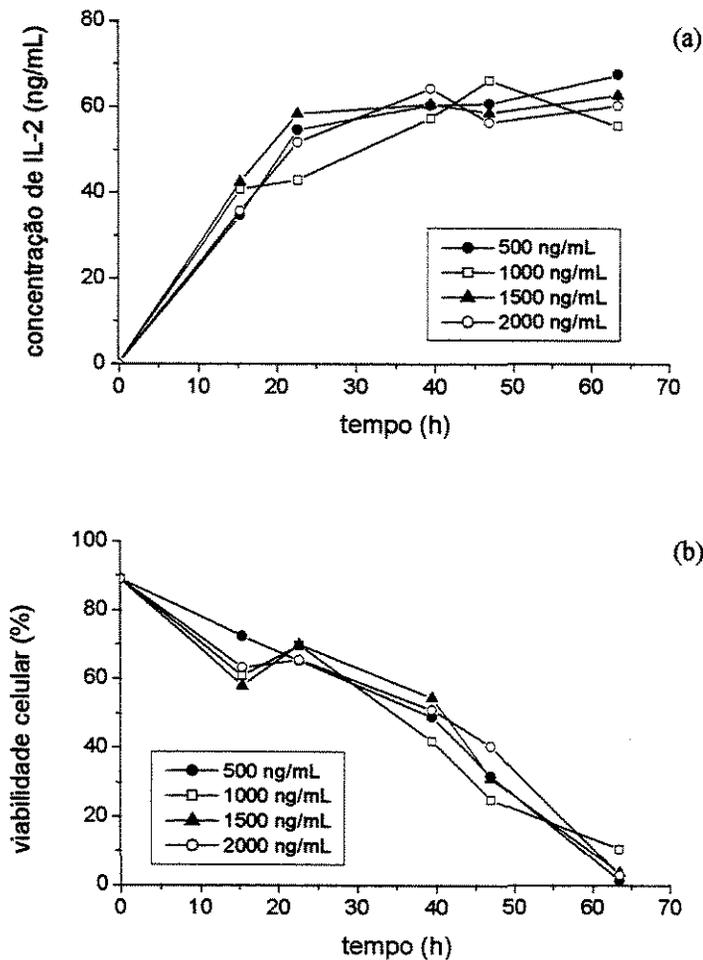


Figura 5.7: Efeito de diferentes concentrações de PMA (500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL) sobre a concentração de IL-2 e a viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em placas de 6 poços, e estas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO₂. As células foram inoculadas a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células viáveis por mililitro.

Verificou-se que as concentrações finais de IL-2 obtidas não foram muito elevadas, ficando em torno de 60 ng/mL, e que este valor foi atingido dentro de cerca de 30 horas para a maioria dos ensaios. Observou-se também que as diferentes culturas com concentrações distintas de PMA apresentaram comportamentos semelhantes, mostrando que, na ausência de SFB, concentrações do indutor de 500 a 2000 ng/mL levam praticamente aos mesmos resultados, tanto de produção de IL-2 quanto de crescimento celular.

O aumento máximo verificado na concentração celular foi de cerca de 1,5 vezes, enquanto a viabilidade das células decaiu continuamente, aproximando-se de zero ao final do cultivo. Destaca-se que comportamento similar foi observado após 23 horas de cultivo em meio livre de PMA contendo 10% de SFB, conforme ilustrado na Figura 5.1. Entretanto, no referido ensaio, a viabilidade manteve-se superior a 80% dentro das primeiras 20 horas de cultivo.

Embora os resultados em termos de viabilidade e concentração celular tenham sido compatíveis com os observados nos estudos anteriores, as concentrações de IL-2 verificadas apresentaram valores menores. Esta baixa produção pode estar relacionada à ausência de SFB, embora os estudos anteriores indicassem como vantajosa a sua supressão. Observando-se o resultado do ensaio 2 da Tabela 5.6, verifica-se que o maior valor de concentração de IL-2, de 162 ng/mL, foi obtido na presença de 1,45% de SFB, o que pode indicar que quantidades reduzidas de soro são necessárias para o cultivo satisfatório desta linhagem celular. Além disso, os ensaios realizados segundo planejamento fracionário 2^{5-1} também indicaram que a presença de soro fetal bovino foi importante, o que confirma a necessidade da presença de SFB para uma maior produção de IL-2.

5.6. Ampliação da Escala de Cultivo

Os dados obtidos ao longo do trabalho indicam que o meio de cultura adequado para a obtenção de concentrações mais elevadas de IL-2 deve conter 856 ng/mL de PMA e 1,5% de soro fetal bovino, concentrações com as quais obteve-se a maior quantidade de IL-2, segundo o planejamento fatorial completo 2^2 com pontos axiais apresentado anteriormente.

Dois ensaios foram então realizados para a produção deste composto em maior escala, em batelada, empregando frascos do tipo *spinner*, que representam razoavelmente bem um reator do tipo tanque agitado. As concentrações de inóculo e glutamina foram de $1,0 \times 10^6$ cel/mL e 0,3 g/L, respectivamente. O percentual de Pluronic F68 foi mantido em 0,2%. As concentrações de glicose, ácido láctico e amônio foram monitoradas em ambos os ensaios, enquanto a concentração de aminoácidos foi monitorada apenas no segundo experimento.

Como verifica-se na Figura 5.8, a concentração de IL-2 atingiu níveis muito menores que os obtidos em experimentos anteriores. No Ensaio 1, a produção atingiu cerca de 30 ng/mL após 20 horas de incubação, e manteve-se neste valor até o final do cultivo, não reproduzindo o ensaio anterior onde a concentração obtida foi de 162 ng/mL. No Ensaio 2, a concentração de IL-2 obtida foi ainda menor, atingindo cerca de 16 ng/mL após 44 horas de cultivo.

A duração da fase lag nos dois ensaios foi um pouco menor que 10 horas, como nos ensaios onde o PMA não estava presente. No Ensaio 1, a fase exponencial durou cerca de 35 a 40 horas. A velocidade máxima de crescimento específica foi de $0,0249 \text{ h}^{-1}$ e a viabilidade celular manteve-se acima de 70% durante as primeiras 30 horas de cultivo, diminuindo continuamente após este período. A queda de viabilidade está provavelmente relacionada à ausência de glicose, já que em 30 horas toda a glicose presente no meio de cultura (2,0 g/L) já havia sido consumida (Figura 5.9). No Ensaio 2, a duração da fase exponencial foi de apenas 20 horas, e a velocidade máxima de crescimento específica também apresentou um menor valor, sendo $0,0169 \text{ h}^{-1}$. A viabilidade celular manteve-se acima de 80% durante as primeiras 30 horas, período em que havia presença de glicose no meio de cultura, atingindo um valor de 67% no final do cultivo.

Como observa-se na Figura 5.9, para ambos os ensaios, a formação de lactato e de amônio e o consumo de glicose apresentaram comportamentos semelhantes. O consumo de glicose e a produção de ácido láctico acompanharam o crescimento celular. Com a ausência de glicose após 30 horas de cultivo, as células começaram a perder viabilidade e não houve produção adicional de lactato. Apesar disso, pode-se observar no Ensaio 1 que a massa celular teve um aumento significativo após este período, o que pode indicar que as células utilizam a glicose como fonte de carbono para o crescimento celular e a glutamina para a manutenção celular. A glicose mostrou-se um componente importante com a realização

destes ensaios, e poderia ser estudada em trabalhos futuros. A formação de amônia ocorreu durante todo o cultivo, atingindo cerca de 25 mg/L no Ensaio 1 e 16 mg/L no Ensaio 2.

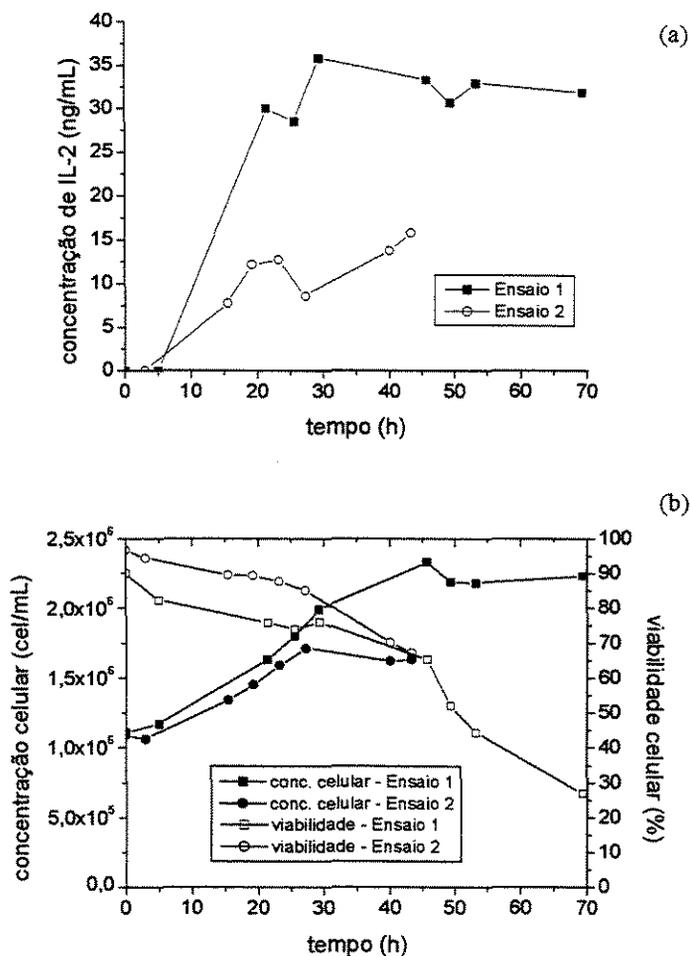


Figura 5.8: Ensaio cinético com monitoramento da concentração de IL-2 (a) e de células totais e viabilidade celular (b). Os ensaios foram realizados em frasco *spinner* mantido a 37°C, com 5% de CO₂. As células foram inoculadas a uma concentração de 1,0 x 10⁶ cel/mL.

A concentração de aminoácidos durante o cultivo também foi monitorada no Ensaio 2, e pode ser observada na Figura 5.10. Verifica-se que não houve escassez de nenhum aminoácido e que todos apresentaram pouca variação nas concentrações durante o cultivo, com exceção da alanina, que é um dos produtos formados no metabolismo da glutamina (Augusto e Oliveira, 2001). Não houve ausência também de glutamina, fonte de carbono e nitrogênio essencial para o metabolismo celular. A maior concentração de glutamina

verificada no início deste ensaio (cerca de 0,55 g/L) deve-se à adição de 0,3 g/L deste composto no meio de cultura, já que o meio havia sido estocado em geladeira durante cerca de um mês e a decomposição de parte da glutamina seria provável nesta situação (Sigma-Aldrich, 2002). Assumiu-se então que toda a glutamina presente no meio de cultura poderia ter sido decomposta e adicionou-se a mesma quantidade presente no meio formulado. A menor concentração de IL-2 obtida neste ensaio não pode ter sido causada por uma provável toxicidade decorrente da maior concentração de glutamina, já que ensaios anteriores mostraram que a variação deste composto de 0,3 para 0,6 g/L não ocasionou diferenças significativas na produção de IL-2.

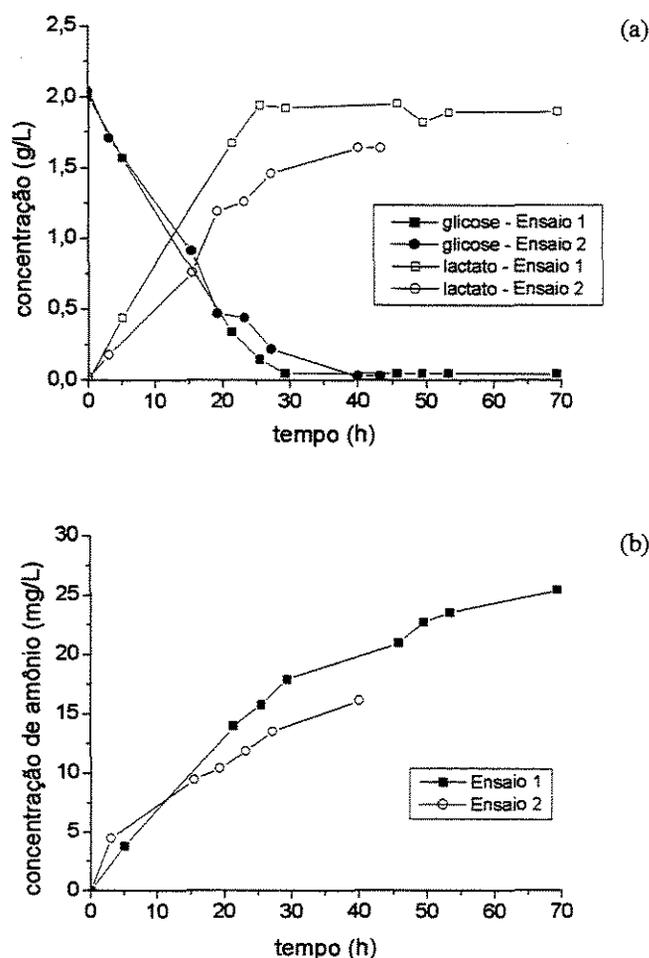


Figura 5.9: Monitoramento das concentrações de glicose, ácido láctico (a) e amônio (b) em ensaio realizado em frasco *spinner*.

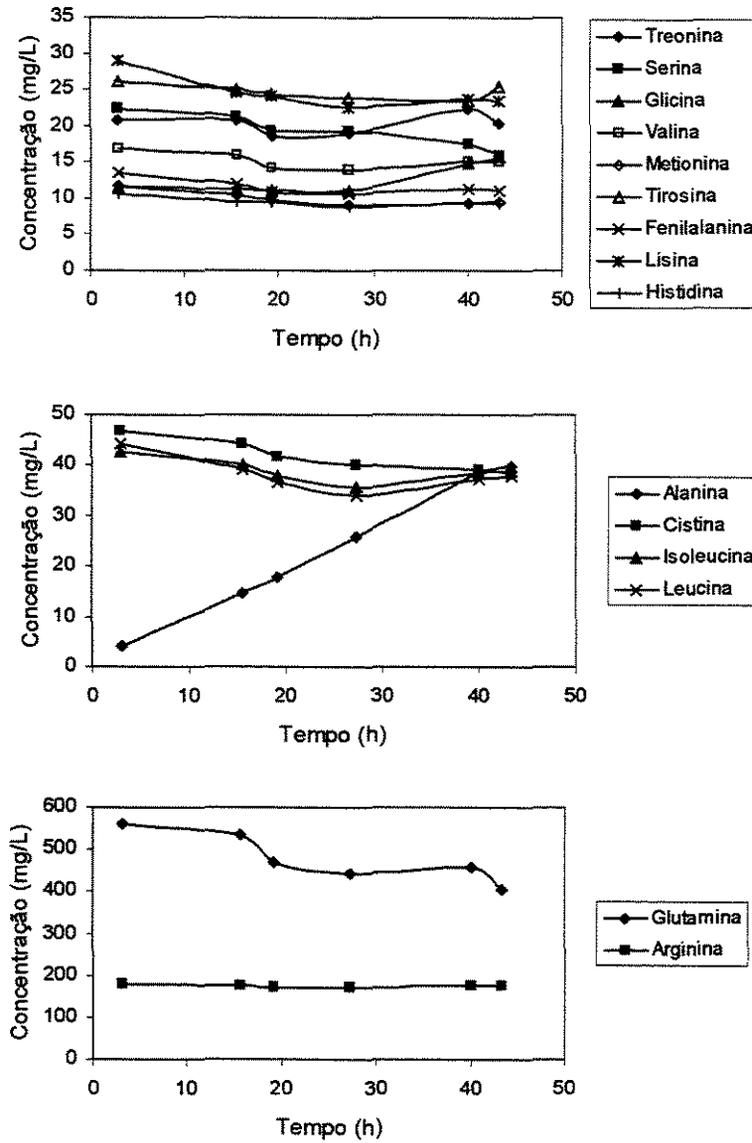


Figura 5.10. Variação das concentrações de aminoácidos para o Ensaio 2.

Para comparação com os ensaios realizados em *spinner*, fez-se um experimento estático em placas de cultura. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.11. A concentração de IL-2 também foi baixa, não atingindo o valor obtido anteriormente, mas foi mais elevada que o obtido com o ensaio realizado em *spinner*. Após cerca de 20 horas, a concentração atingiu cerca de 50 ng/mL e manteve-se neste nível durante todo o restante do cultivo. A fase lag de crescimento celular para este ensaio foi de cerca de 20 horas, maior que as verificadas para os ensaios em *spinner*. Neste experimento, a fase exponencial teve

duração de cerca de 10 horas, tempo menor que os observados para o Ensaio 1 (35-40 horas) e o Ensaio 2 (20 horas). A velocidade específica máxima de crescimento celular foi de $0,0327 \text{ h}^{-1}$ e a viabilidade manteve-se alta (acima de 80%) durante as 30 primeiras horas de cultivo, decaindo continuamente após este período, provavelmente devido à falta de glicose no meio de cultura. A concentração celular total máxima atingida neste ensaio foi de $1,66 \times 10^6 \text{ cel/mL}$.

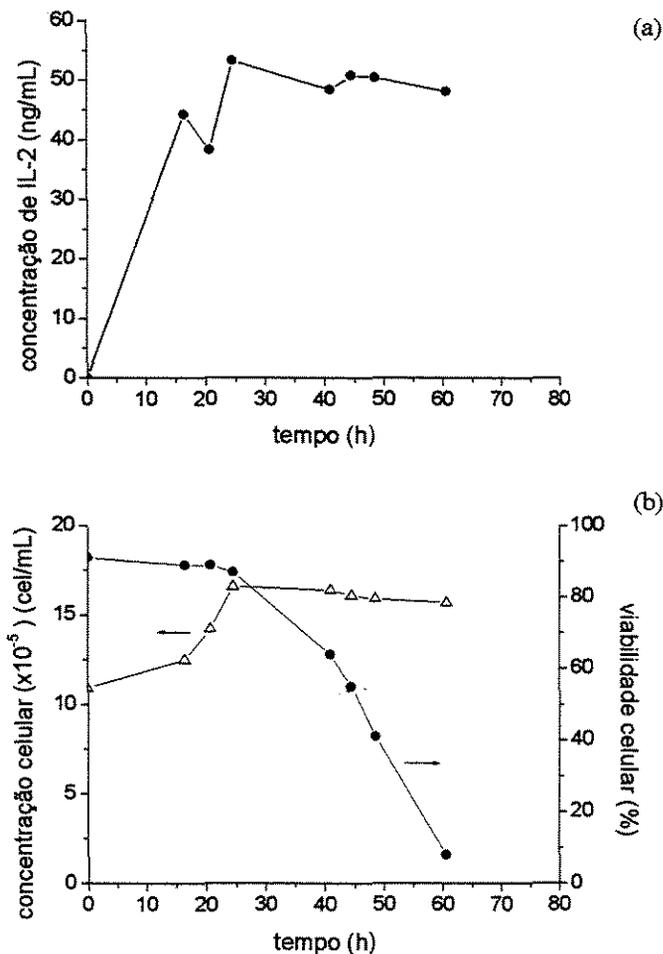


Figura 5.11: Ensaio cinético com monitoramento da concentração de IL-2 (a) e de células totais e viabilidade celular (b). Os ensaios foram realizados em placas de 6 poços mantidas a 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO_2 . As células foram inoculadas a uma concentração de $1,0 \times 10^6 \text{ cel/mL}$.

Analisando-se os ensaios realizados segundo planejamento fatorial, observa-se que a concentração de IL-2 final foi maior nos ensaios onde a viabilidade apresentou valores menores. Comportamento semelhante também pode ser observado na Figura 5.3, onde ocorre um aumento significativo da concentração de IL-2 embora se verifique uma queda contínua da viabilidade, o que poderia indicar uma provável liberação de IL-2 por lise celular. Entretanto, analisando-se os resultados obtidos nestes últimos experimentos (Figuras 5.8 e 5.11), verifica-se que a concentração de IL-2 se mantém constante com a diminuição da viabilidade celular, indicando que possivelmente a IL-2 não é liberada por lise celular, e sim continuamente produzida e excretada. Além disso, neste caso é provável que a morte celular esteja ocorrendo por apoptose, onde o conteúdo celular não é liberado para o meio de cultura.

Comparando-se os dados provenientes dos ensaios cinéticos realizados de maneira estática e sob agitação, apresentados na Tabela 5.26, verifica-se que ocorreram diferenças significativas no comportamento celular, particularmente em relação à produção da citocina. A concentração de IL-2 apresentou valores menores no ensaio em *spinner*, e esta menor produção de IL-2 pode ser atribuída a várias fontes de erro. Um dos responsáveis pela redução na quantidade de IL-2 produzida pode ser o estresse causado às células devido ao cisalhamento provocado pela agitação. Os menores valores de concentração de IL-2 nestes últimos experimentos podem estar também relacionados ao ensaio de detecção de IL-2, já que apenas um kit não foi suficiente para realizar todos os ensaios, e um novo foi utilizado para a realização dos experimentos feitos em frascos *spinner*. Como mencionado anteriormente, a detecção de produtos por ELISA tem um erro associado de cerca de 10%, dentro de um mesmo ensaio, e este erro pode ter sido maior ao utilizar o kit de um novo lote. Outro fator importante foi a troca do banco celular de trabalho, devido a contaminações e problemas com o crescimento celular, embora todos os cuidados para a formação do novo banco tenham sido tomados de modo a minimizar eventuais diferenças. Os problemas na reprodutibilidade de ensaios de diferentes lotes poderiam também ser atribuídos à metodologia de obtenção dos inóculos, que se fundamentava na coleta das células quando da obtenção de 60 a 80% de cobertura. Este parâmetro (grau de cobertura da superfície) pode não ser suficiente para a avaliação da adequação do inóculo, e os resultados indicam que seria recomendável, em ensaios futuros, fixar as concentrações

celulares inicial e final, além de coletar as células garantidamente durante a fase exponencial.

Tabela 5.26: Comparação dos resultados obtidos nos ensaios cinéticos em batelada em placas estáticas de poliestireno e em biorreator do tipo *spinner*.

Resultado	Placas	Biorreator	
		Ensaio 1	Ensaio 2
Duração aproximada da fase lag (h)	20	10	10
Taxa máxima específica de crescimento celular (h^{-1})	0,0327	0,0249	0,0169
Tempo de duplicação celular (h)	21,2	27,8	41,0
Duração aproximada da fase de crescimento exponencial (h)	10	35-40	20
Concentração de IL-2 após cerca de 20 horas de cultivo (ng/mL)	50	30	12
Concentração de células no final do cultivo (cel/mL)	$1,66 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$1,63 \times 10^6$

No ensaio estático, a produção de IL-2 ocorreu principalmente durante a fase lag, e a velocidade máxima de crescimento específica foi cerca de 31% maior que no Ensaio 1 e 93% maior que no Ensaio 2. Apenas a viabilidade celular apresentou comportamento semelhante entre os ensaios. A concentração de células total apresentou valor maior no Ensaio 1 realizado em *spinner*, sendo bem próxima no ensaio estático e no Ensaio 2.

Capítulo VI

Conclusões e Sugestões

6.1. Conclusões

Os estudos realizados com a finalidade de estudar a influência da composição do meio de cultura na produção de interleucina-2 e no crescimento e na viabilidade das células EL-4, levaram às seguintes conclusões:

- O baixo percentual de soro fetal bovino não teve grande efeito sobre o crescimento e a viabilidade das células EL-4 não estimuladas com PMA. Portanto, o cultivo poderia ser realizado a uma baixa concentração de SFB, minimizando custos de produção e dificuldades nos processos de separação e purificação.
- Nos ensaios estáticos, a maior taxa produção de IL-2 ocorreu durante a fase lag do crescimento celular, onde as células sintetizam substâncias que auxiliam sua adaptação ao novo ambiente.
- Nas faixas estudadas, as concentrações de glutamina e Pluronic F68 não mostraram efeitos significativos sobre a produção de IL-2 e o crescimento celular.
- A maior produção de IL-2 ocorreu, de uma maneira geral, para a concentração de inóculo de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

- As variáveis que mais influenciaram a produção de IL-2 foram a concentração de PMA e a percentagem de soro fetal bovino. A maior concentração de IL-2 obtida foi de 162 ng/mL, com uma concentração de PMA de 856 ng/mL e uma percentagem de SFB de 1,45%. Na ausência de PMA não houve produção de IL-2.
- O efeito negativo da adição de soro fetal bovino sobre a viabilidade celular pode estar relacionado ao longo tempo de cultivo. Em 40 horas, pode ter ocorrido escassez de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos.
- A presença de soro fetal bovino em baixas concentrações mostrou-se necessária para a obtenção de interleucina-2 em concentrações mais elevadas. Na ausência total deste composto, a produção de IL-2 foi menor.
- A adição de PMA isoladamente mostrou ser mais eficiente na indução da produção de IL-2 que a adição deste composto em conjunto com a concanavalina A. Estes indutores não apresentaram efeito sinérgico.
- O meio de cultura para a obtenção de concentrações mais elevadas de IL-2 deveria conter, de acordo com os ensaios do planejamento fatorial, 856 ng/mL de PMA e 1,5% de SFB. Os ensaios cinéticos realizados na condição ótima do meio de cultura, entretanto, não reproduziram a concentração de IL-2 obtida anteriormente (162 ng/mL). Para o ensaio em *spinner* o valor máximo obtido foi de cerca de 30 ng/mL, e no ensaio estático, de 50 ng/mL.
- O comportamento apresentado pelas células nos ensaios realizados sob agitação em frascos *spinner* foi diferente daquele apresentado no ensaio estático. A duração da fase lag foi maior no ensaio estático e a produção de IL-2 ocorreu principalmente neste período. A velocidade de crescimento específica máxima foi maior no ensaio estático e a duração da fase exponencial foi menor.

6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

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

- Verificação do efeito da concentração de glicose no comportamento das células EL-4 e na produção de interleucina-2, já que esta variável mostrou-se importante nos ensaios realizados em maior escala onde a concentração deste composto foi monitorada.
- Avaliação do comportamento celular e da produção de interleucina-2 em processos com biorreatores operando em modo de batelada alimentada.
- Avaliação do comportamento celular e da produção de interleucina-2 em processos com biorreatores operando em modo contínuo.
- Realização de bioensaios para verificar a atividade da interleucina-2 produzida, comparando os dados obtidos a dados da literatura.

Capítulo VII

Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S., *Cellular and Molecular Immunology*, 4ª edição, W. B. Saunders, 2000.

AUGUSTO, E.F.P., OLIVEIRA, M.S., Processos com Células Animais. In: *Biotecnologia Industrial*, volume 3, Editora Edgard Blüncher, 1ª edição, pp. 593, p. 547-582, 2001.

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

BOULOUGOURIS, G., MCLEOD, J.D., PATEL, Y.I., ELLWOOD, C.N., WALKER, L.S.K., SANSOM, D.M., IL-2-independent activation and proliferation in human T cells induced by CD28, *Journal of Immunology*, v. 163, n. 4, p. 1809-1816, 1999.

CHATTOPADHYAY, D., RATHMAN, J.F., CHALMERS, J.J., The Protective Effect of Specific Medium Additives with Respect to Bubble Rupture, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 45, p. 473-480, 1995.

CHISTI, Y., Animal-Cell Damage in Sparged Bioreactors, *Trends in Biotechnology*, v. 18, p. 420-432, 2000.

DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D., *Molecular Cell Biology*, 2ª edição, Scientific American Books, 1990.

DONG, W., AZCONA-OLIVERA, J.I., BROOKS, K.H., LINZ, J.E., PESTKA, J.J., Elevated Gene Expression and Production of Interleukins 2, 4, 5, and 6 during Exposure to Vomitoxin (Deoxynivalenol) and Cyclohexidime in the EL-4 Thymoma, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 127, p. 282-290, 1994.

EVANS, F. J., *Naturally Occurring Phorbol Esters*, CRC Press, 1986.

FARRAR, J.J., FULLER-FARRAR, J., SIMON, P.L., HILFIKER, M.L., STADLER, B.M., FARRAR, W.L., Thymoma Production of T Cell Growth Factor (Interleukin 2), *Journal of Immunology*, v. 125, n. 6, p. 2555-2558, 1980.

FRESHNEY, R.I., *Animal Cell Culture – A Practical Approach*, IRL Press, 1989.

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

FULLER-FARRAR, J., HILFIKER, M.L., FARRAR, W.L., FARRAR, J.J., Phorbol Myristic Acetate Enhances the Production of Interleukin 2, *Cellular Immunology*, v. 58, p. 156-164, 1981.

Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, 2002.

KRATJE, R.B., WAGNER, R., Evaluation of Production of Recombinant Human Interleukin-2 in Fluidized Bed Reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 62, n. 2, p. 233-242, 1992.

LASEK, W., STEER, S., CLOTHIER, R., BALLS, M., The Stimulation of EL-4 Cells to Produce Interleukin-2 and its Potencial Use in Immunocytotoxicity Testing, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 11, n. 2-3, p. 379-396, 1989.

LI, S., OUYANG, Y. L., DONG, W., PESTKA, J. J., Superinduction of il-2 gene expression by vomitoxin (deoxynivalenol) involves increased mRNA stability. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 147, p. 331–342, 1997.

MIRE-SLUIIS, A.R., Cytokines: from Technology to Therapeutics, *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 319-325, 1999.

MIRE-SLUIIS, A.R., THORPE, R., Laboratory Protocols for the Quantitation of Cytokines by Bioassay using Cytokine Responsive Cell Lines, *Journal of Immunological Methods*, v. 211, p. 199-210, 1998.

- OUYANG, Y.L., LI, S., PESTKA, J.J., Effects of Vomitoxin (Deoxynivalenol) on Transcription Factor NF- κ B/Rel Binding Activity in Murine EL-4 Thymoma and Primary CD4⁺ Cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 140, p. 328-336, 1996.
- PAETKAU, V., RIENDEAU, D., BLEACKLEY, R.C., Murine Interleukin 2, *Methods in Enzimology*, v. 116, p. 526-539, 1985.
- PÖRTNER, R., SCHÄFER, T., Modelling hybridoma cell growth and metabolism - a comparison of selected models and data, *Journal of Biotechnology*, v. 49, p. 119-135, 1996.
- R & D SYSTEMS, Disponível na Internet, http://www.rndsystems.com/asp/r_il2_mini.asp, 2000.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., *Imunologia*, Editora Manole, 5ª edição, pp. 423, 1999.
- ROSENBERG, S. A., Progress in human tumor immunology and immunotherapy, *Nature*, v. 411, p. 380-384, 2001.
- SANDERSON, C.S., BARFORD, J.P., BARTON, G.W., A structure, dynamic model for animal cell culture systems, *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, p. 203-211, 1999.
- SHULER, M.L., KARGI, F., *Bioprocess Engineering – Basic Concepts*, Prentice Hall, 1992.
- SIGMA-ALDRICH, Disponível na Internet, <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/g7513inf.pdf>, 2002.
- STITES, D.P., TERR, A.I., PARSLOW, T.G., *Basic and Clinical Immunology*, Prentice-Hall International, 1994.
- VAN DER POL, L. e TRAMPER, J., Shear Sensitivity of Animal Cells from a Culture-Medium Perspective, *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 323-328, 1998.
- WALSH, G. e HEADON, D., *Protein Biotechnology*, John Wiley & Sons, 1994.
- YU, W., SANDERS, B.G. e KLINE, K., Modulation of murine EL-4 thymic lymphoma cell proliferation and cytokine production by vitamin E succinate, *Nutrition and Cancer – An International Journal*, v. 25, n. 2, p. 137-149, 1996.