

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E CINÉTICA DO CULTIVO**  
**DE TRÊS HIBRIDOMAS PARA PRODUÇÃO DE**  
**IMUNOGLOBULINAS COM ESPECIFICIDADE A ANTÍGENOS**  
**ERITROCITÁRIOS PARA USO HEMOTERÁPICO**

**DOUGLAS FERREIRA**

**SÃO CARLOS**

**2007**

**CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E CINÉTICA DO CULTIVO  
DE TRÊS HIBRIDOMAS PARA PRODUÇÃO DE  
IMUNOGLOBULINAS COM ESPECIFICIDADE A ANTÍGENOS  
ERITROCITÁRIOS PARA USO HEMOTERÁPICO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E CINÉTICA DO CULTIVO**  
**DE TRÊS HIBRIDOMAS PARA PRODUÇÃO DE**  
**IMUNOGLOBULINAS COM ESPECIFICIDADE A ANTÍGENOS**  
**ERITROCITÁRIOS PARA USO HEMOTERÁPICO**

**DOUGLAS FERREIRA**

**Dissertação de Mestrado apresentada**  
**ao Programa de Pós-graduação em**  
**Engenharia Química da Universidade Federal**  
**de São Carlos como parte dos requisitos**  
**necessários à obtenção do título de Mestre em**  
**Engenharia Química, área de concentração:**  
**Pesquisa e Desenvolvimento de Processos**  
**Químicos.**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alberto**  
**Torres Suazo**

**São Carlos – SP**

**2007**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F383cm

Ferreira, Douglas.

Caracterização metabólica e cinética do cultivo de três hibridomas para produção de imunoglobulinas com especificidade e antígenos eritrocitários para uso hemoterápico / Douglas Ferreira. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

104 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Hibridomas. 2. Células cultivadas. 3. Célula animal. 4. Soro fetal bovino. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

“Se um dia já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras se desmoronam, que não tens ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela mocidade, volta a tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperança, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: meu pai, minha mãe”

Rui Barbosa

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos e familiares, por tudo que representam em minha vida.

A memória de meu primo Júlio César Xavier.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo e toda sua família pela orientação, apoio, respeito e amizade;

Ao Hemocentro da FMB/Unesp/Botucatu, em especial a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elenice Deffune, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosana Rossi Ferreira, Andrei Moroz, Fátima Regina Guimarães (Tata), Marina de Oliveira e Souza, Carlos Tognolli pelo apoio, incentivo e dedicação;

Aos companheiros de república Renato Ribeiro Franco, Benecildo Riguetto Amauri, Marcelo Roberto Terrabuino;

Aos amigos Tarcísio Laerte Gontijo, Lucas Estevam Pessoa, Pedro Henrique Amaral, Felipe Eduardo de Castro Pessoa, Lara Marie Reinhard;

Aos inesquecíveis avós adotivos que me cativaram e me transmitiram o verdadeiro significado da palavra jovialidade, sempre estaram comigo, Luiz Fabri,, Elza Spina, Carmelita Spina;

Aos amigos Arnúbio Valencia Jiménez (Unb), Marcelo Moreira Freire (CEFET/MG), Francisco Frederico Perlison Arantes (DQ/UFV), Josie Faria Gomes (DB/UFV), Thiago André Moura Veiga (DQ/UFSCar), Sebastião da Cruz Silva (DQ/UFSCar), Márcio Santos Soares (DQ/UFSCar), Joseli Ludgero Alves, Jeferson Spina, Valdir, Francisco, Ademir;

Aos amigos do DEQ/UFSCar Marcos Alceu Felicetti, Álvaro Baptista Neto, Patrícia Aparecida Santiago, Sílvia Naomi Soida Hirayama, Sheila Cristina Alves Ortiz, Daniela Battaglia Hirata, Jaine H. Hortolan Luiz de Oliveira, Nickeli Rossi, Mabel Karina Arantes, Lucas Barato de Souza, Luciana Futiwaki, Amadeus Gomes de Azevedo, Clóvis Sacardo da Silva, Alexandre Campesi, Marcel Otávio Cerri, Juliana Craven, Carolina Bellão, Bruna Gabriela Silva, Kamilla Swiech, Débora Faria Fonseca, Eliton da Silva Vasconcelos;

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSCar.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - OBJETIVO .....	5
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 - A CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	5
3.2 - OS ANTICORPOS MONOCLONAIS NA ATUALIDADE .....	9
3.3 - OS PRINCIPAIS SUBSTRATOS NECESSÁRIOS NO CULTIVO .....	11
3.4 - ACÚMULO DE METABÓLITOS .....	14
3.5 - ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DE METABÓLITOS TÓXICOS .....	17
3.6 - OXIGÊNIO E OUTROS GASES NO CULTIVO .....	18
3.7 - INFLUÊNCIA DO pH NO CULTIVO CELULAR .....	20
3.8 - EFEITOS DA AGITAÇÃO NO CULTIVO .....	21
3.9 - A EXPRESSÃO DAS IMUNOGLOBULINAS .....	22
3.10 – CULTIVO DE HIBRIDOMAS EM DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO..	25
3.11 – COMENTÁRIOS FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	28
4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.1 - MATERIAIS .....	29
4.1.1 - LINHAGENS DE HIBRIDOMAS .....	29
4.1.2 - MEIO DE CULTURA UTILIZADO .....	30
4.1.3 – CORANTES .....	30

4.1.4 – EQUIPAMENTOS .....	30
4.1.4.1 – CÂMARA ASSÉPTICA .....	30
4.1.4.2 – CENTRÍFUGA .....	31
4.1.4.3 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO .....	31
4.1.4.4 – MICROSCÓPIO .....	31
4.1.4.5 – FRASCOS DE CULTURA E VIDRARIAS .....	32
4.2 - MÉTODOS .....	32
4.2.1 – ANÁLISES QUÍMICAS .....	32
4.2.2 - CONTAGEM E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	33
4.2.3 - VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO CELULAR .....	34
4.2.4 - TEMPO DE GERAÇÃO, $T_G$ .....	35
4.2.5 – PROCEDIMENTO DE CONGELAMENTO E ESTOCAGEM DOS TRÊS HIBRIDOMAS .....	35
4.2.6 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO NO CULTIVO DOS TRÊS HIBRIDOMAS .....	36
4.2.7 – PLANEJAMENTO DO TRABALHO .....	38
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.1 - ETAPA 1 .....	40
5.1.1 - EXPERIMENTO I-ED-20% .....	40
5.1.2 - EXPERIMENTO II-NAKA-20% .....	44
5.1.3 – EXPERIEMENTO III-TAN-20% .....	48
5.1.4 – COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CRESCIMENTO CELULAR A 20 % v/v SFB DAS TRÊS DIFERENTES LINHAGENS EM ESTUDO .....	53
5.2 - ETAPA 2 .....	54
5.2.1 - EXPERIMENTO IV-ED-10% .....	55

5.2.2 EXPERIMENTO V-NAKA-10% .....	62
5.2.3 EXPERIMENTO VI-TAN-10% .....	71
5.2.4 – COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CRESCIMENTO CELULAR A 10 % v/v SFB DAS TRÊS DIFERENTES LINHAGENS EM ESTUDO .....	76
6 – CONCLUSÕES .....	79
7 - GLOSSÁRIO .....	82
8 – BIBLIOGRAFIA .....	83
APÊNDICE A .....	88
APÊNDICE B.....	90

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Esquema ilustrativo de todas as etapas realizadas durante a obtenção de hibridomas.....	8
<b>Figura 3.2</b>	Representação de modo de operação em batelada (a), modo de operação em batelada alimentada (b), modo de operação contínuo (c).....	26
<b>Figura 4.1</b>	Representação de câmara de Neubauer utilizada nas contagens de células de hibridomas.....	34
<b>Figura 4.2</b>	Representação esquemática do procedimento do cultivo dos hibridomas. Iniciava-se com o descongelamento do criotubo proveniente do nitrogênio líquido, seguido de cultivo estático em frascos de cultura celular de 25 cm <sup>2</sup> e 75 cm <sup>2</sup> até atingir concentração celular desejada. A seguir, fazia-se cultivo em frasco Schott sob agitação com barra magnética no intuito de adaptar as células ao estresse mecânico do cultivo dinâmico. Finalmente, fazia-se o cultivo em frasco Spinner devidamente aerado com uso de sistema de membrana de silicone.....	37
<b>Figura 5.1</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	41
<b>Figura 5.2</b>	Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato e ácido glutâmico no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	41
<b>Figura 5.3</b>	Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o cultivo celular no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	42
<b>Figura 5.4</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o Experimento II-NAKA-20%-a no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.....	44
<b>Figura 5.5</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o Experimento II-NAKA-20%-b no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.....	46
<b>Figura 5.6</b>	Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento II-NAKA-20%-b no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.....	46

<b>Figura 5.7</b>	Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento II-NAKA-20%-b no cultivo celular do hibridoma NAKA4-56A137.....	47
<b>Figura 5.8</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o Experimento III-TAN-20% no cultivo do hibridoma TAN1-112A18.....	50
<b>Figura 5.9</b>	Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento III-TAN-20% no cultivo do hibridoma TAN1-112A18.....	50
<b>Figura 5.10</b>	Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento III-TAN-20% no cultivo celular do hibridoma TAN1-112A18.....	51
<b>Figura 5.11</b>	Comparação do comportamento de crescimento em concentrações de 20 % v/v de SFB das linhagens de hibridomas murinos em estudo.....	54
<b>Figura 5.12</b>	Evolução da viabilidade celular da linhagem ED7-183A12 em diferentes concentrações de SFB com o intuito de conseguir uma adaptação estável a 10 % v/v de SFB.....	55
<b>Figura 5.13</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-a realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	56
<b>Figura 5.14</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-b realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	57
<b>Figura 5.15</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	58
<b>Figura 5.16</b>	Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento IV-ED-10%-c no cultivo do hibridoma ED7-183A12.....	59
<b>Figura 5.17</b>	Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento IV-ED-10%-c no cultivo celular do hibridoma ED7-183A12.....	59
<b>Figura 5.18</b>	Comparação do comportamento de crescimento do hibridoma ED7-183A12 em concentrações de 20 – 10 % v/v de SFB e aumento de 10 % na concentração dos componentes do meio de cultura.....	61

<b>Figura 5.19</b>	Evolução da viabilidade celular da linhagem NAKA4-56A137 em diferentes concentrações de SFB com o intuito de conseguir uma adaptação estável a 10 % v/v de SFB.....	63
<b>Figura 5.20</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento V-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	64
<b>Figura 5.21</b>	Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento V-NAKA-10%-a no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.....	64
<b>Figura 5.22</b>	Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-a no cultivo celular do hibridoma NAKA4-56A137.....	65
<b>Figura 5.23</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento V-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	67
<b>Figura 5.24</b>	Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento V-NAKA-10%-b no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.....	68
<b>Figura 5.25</b>	Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-b no cultivo celular do hibridoma NAKA4-56A137.....	68
<b>Figura 5.26</b>	Comparação do comportamento de crescimento do hibridoma NAKA4-56A137 em concentrações de 20 – 10 % v/v de SFB e aumento de 10 % na concentração dos componentes do meio de cultura.....	70
<b>Figura 5.27</b>	Evolução da viabilidade celular da linhagem TAN1-112A18 em diferentes concentrações de SFB com intuito de conseguir uma adaptação estável a 10 % v/v de SFB.....	72
<b>Figura 5.28</b>	Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	73
<b>Figura 5.29</b>	Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	73
<b>Figura 5.30</b>	Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o cultivo celular no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	74

- Figura 5.31** Comparação do comportamento de crescimento do hibridoma TAN1-112A18 em concentrações de 20 – 10 % v/v de SFB e aumento de 10 % na concentração dos componentes do meio de cultura..... 75
- Figura 5.32** Comparação do comportamento de crescimento em concentrações de 10 % v/v de SFB das três linhagens de hibridomas murinos em estudos..... 77
- Figura A.1** Cromatograma da amostra do cultivo do hibridoma NAKA4-56A137 no Experimento V-NAKA-10%-a obtido por HPLC para determinação da concentração de aminoácidos após 92 horas do início do experimento..... 88
- Figura A.2** Cromatograma da amostra do cultivo do hibridoma TAN1-112A18 no Experimento VI-TAN-10% obtido por HPLC para determinação da concentração de lactato após 84 horas do início do experimento..... 88
- Figura A.3** Cromatograma da amostra do cultivo do hibridoma NAKA4-56A137 no Experimento V-NAKA-10%-b obtido por HPLC para determinação da concentração de glicose no tempo inicial do experimento..... 89
- Figura A.4** Cromatograma da amostra do padrão de Glutamx (GIBCO™) obtido por HPLC para determinação da concentração de glutamina nos experimentos.. 89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b>	Composição do meio de cultura utilizado no cultivo dos hibridomas murinos.....	30
<b>Tabela 4.2</b>	Programação geral dos experimentos de cultivo que foram realizados com os três hibridomas.....	39
<b>Tabela 5.1</b>	Consumo de aminoácidos durante o Experimento I-ED-20%.....	42
<b>Tabela 5.2</b>	Consumo de aminoácidos durante o Experimento II-NAKA-20%.....	47
<b>Tabela 5.3</b>	Consumo de aminoácidos durante o Experimento III-TAN-20%.....	51
<b>Tabela 5.4</b>	Velocidade específica máxima de crescimento celular em concentrações de 20 % v/v de SFB das três diferentes linhagens de hibridomas murinos em estudo.....	54
<b>Tabela 5.5</b>	Consumo de aminoácidos durante o Experimento IV-ED-10%.....	60
<b>Tabela 5.6</b>	Comparação da velocidade específica máxima de crescimento celular dos cultivos realizados com a linhagem de hibridoma murino ED7-183A12 em meios de cultura com diferentes concentrações de SFB e aminoácidos.....	62
<b>Tabela 5.7</b>	Consumo de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-a.....	65
<b>Tabela 5.8</b>	Consumo de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-b.....	69
<b>Tabela 5.9</b>	Comparação da velocidade específica máxima de crescimento celular dos cultivos realizados com a linhagem de hibridoma murino NAKA4-56A137 em meios de cultura com diferentes concentrações de SFB e aminoácidos.....	71
<b>Tabela 5.10</b>	Consumo de aminoácidos durante o Experimento VI-TAN-10%.....	74
<b>Tabela 5.11</b>	Comparação da velocidade específica máxima de crescimento celular dos cultivos realizados com a linhagem de hibridoma murino TAN1-112A18 em meios de cultura com diferentes concentrações de SFB e aminoácidos.....	76

<b>Tabela 5.12</b>	Velocidade específica máxima de crescimento celular das três diferentes linhagens de hibridomas murinos em estudo nas mesmas condições de cultivo.....	77
<b>Tabela 5.13</b>	Comparação de valores de densidade máxima celular de diferentes linhagens de hibridomas.....	78
<b>Tabela B.1</b>	Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	90
<b>Tabela B.2</b>	Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	90
<b>Tabela B.3</b>	Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	91
<b>Tabela B.4</b>	Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento II-NAKA-20%-b realizado com o hibridoma NAKA456A137.....	92
<b>Tabela B.5</b>	Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento II-NAKA-20%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	92
<b>Tabela B.6</b>	Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento II-NAKA-20%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	93
<b>Tabela B.7</b>	Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento III-TAN-20% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	94
<b>Tabela B.8</b>	Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento III-TAN-20% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	94
<b>Tabela B.9</b>	Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento III-TAN-20% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	95

<b>Tabela B.10</b>	Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	96
<b>Tabela B.11</b>	Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	96
<b>Tabela B.12</b>	Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o hibridoma ED7-183A12.....	97
<b>Tabela B.13</b>	Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	98
<b>Tabela B.14</b>	Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	98
<b>Tabela B.15</b>	Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	99
<b>Tabela B.16</b>	Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	100
<b>Tabela B.17</b>	Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	100
<b>Tabela B.18</b>	Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.....	101
<b>Tabela B.19</b>	Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	102
<b>Tabela B.20</b>	Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.....	102

**Tabela B.21** Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18..... 103

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

Ácido Aspártico = Asp

Ácido Glutâmico =Glu

Alanina = Ala

Arginina = Arg

Cisteína = Cys

Cistina . 2 HCl = Cys(2)

Fenilalanina = Phe

Glutamina = Gln

Glicina = Gly

Histidina = His

Isoleucina = Ile

Leucina = Leu

Lisina = Lys

Metionina = Met

Prolina = Pro

Serina = Ser

Soro Fetal Bovino = SFB

Velocidade específica máxima de crescimento celular =  $\mu_{\text{máx}}$

Tempo de geração =  $T_G$

Tirosina = Tyr

Treonina = Thr

Triptofano = Trp

Valina = Val

## RESUMO

Nas últimas duas décadas o cultivo de células animais tem sido amplamente utilizado para a produção industrial de proteínas de interesse farmacêutico em particular de anticorpos monoclonais, através do cultivo de células híbridas murinas (hibridomas). O desenvolvimento de bioprocessos de alta produtividade em larga escala de produção de anticorpos monoclonais (MAbs – monoclonal antibody) depende da determinação e otimização de vários parâmetros fisiológicos e metabólicos dos hibridomas. Neste trabalho são apresentados dados preliminares para o desenvolvimento de um bioprocessos de produção de três MAbs para tipagem sanguínea pelo sistema ABO, de grande interesse para a saúde pública Brasileira. Experimentos com três linhagens de hibridomas murinos capazes de secretar imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários do sistema sanguíneo ABO humano foram realizados em frascos Spinner usando meio RPMI 1640 e soro fetal bovino (SFB) em concentrações de 20 e 10 % v/v, temperatura de 37 °C e pH 6,8 – 7,4. Os três hibridomas mostraram características de crescimento celular bem diferenciadas nesse meio de cultura. Tanto os cultivos com 20 % v/v de SFB como os cultivos com células adaptadas a 10 % v/v SFB revelaram a necessidade de balanceamento de aminoácidos no meio para melhorar a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e densidade máxima de células ( $C_{Xm\acute{a}x}$ ).

## ABSTRACT

In the last two decades mammalian cell cultures have been broadly used for the industrial production of pharmaceutical, proteins, in particular the monoclonal antibodies by cultures of murine hybrid cells (hybridoma). The development of bioprocess for industrial scale of monoclonal antibodies (MAbs) depends on the determination and optimization of several physiological and metabolic parameters. In this work are shown preliminary development results of the bioprocess for production of three MAbs for blood typing through the ABO system, with is of great interest for Brazilian public health. Experiments with three lineages of murine hybridomas which were able to secret three different immunoglobulins with specificity to ABO human blood antigens were accomplished in Spinner flasks using RPMI 1640 medium and fetal bovine serum (FBS) in concentrations of 20 and 10 % v/v, temperature of 37 °C and pH 6.8 – 7.4 .The three hybridomas showed very different growth patterns in these culture medium The cultivation with 20 % v/v of FBS as much as the cultivation with cells adapted to 10 % v/v FBS showed the necessity of a better balance of the amino acids formulation in the culture medium in order to improve the specific maximum grow rate ( $\mu_{\text{máx}}$ ) and maximum cells density ( $C_{X\text{máx}}$ ).

## 1 - INTRODUÇÃO

Desde a década de 60, tem havido uma notável transformação do conhecimento sobre o sistema imune e suas funções. Inúmeros avanços nas técnicas de culturas de células incluindo a produção de anticorpos monoclonais (MAbs), na imun química, na metodologia do DNA recombinante, na cristalografia de raios X e na criação de animais geneticamente modificados fizeram com que a imunologia passasse de uma disciplina predominantemente descritiva para uma na qual diferentes fenômenos imunológicos podem ser explicados em termos estruturais e bioquímicos (ABBAS *et al.*, 2005).

O sistema imunológico é sem dúvida uma das partes mais complexas dos vertebrados. Vírus, bactérias, fungos e parasitas que invadem esses organismos são reconhecidos e destruídos pelo sistema imune. Na linha de defesa contra os invasores encontram-se os anticorpos, produzidos pelos linfócitos B (glóbulos brancos) com uma grande variedade de modelos moleculares. Os anticorpos são enormes proteínas, também conhecidas como imunoglobulinas, em forma de “Y” que circulam através do sangue e fluidos entre as células, usando um sentido tátil químico para interrogar moléculas que encontram pelo caminho. Cada modelo de anticorpo tem uma função específica: patrulhar o corpo para identificar antígenos, as entidades invasoras que induzem resposta imune (micróbio, agente alergênico ou toxina), e ajudar na sua eliminação (ABBAS *et al.*, 2005).

Desde anunciado o sucesso do crescimento de linhagens de células híbridas de mamíferos (hibridomas) e a produção específica de AMs pelos cientistas agraciados com o prêmio Nobel de 1984 Georges Köhler e César Milstein, os AMs tem tido um grande impacto em pesquisas biológicas devido a sua alta especificidade e reprodutibilidade, podendo ser empregados em análises para diagnóstico, reagente de tipagem sanguínea e inúmeras análises biotecnológicas (KÖHLER *et al.*, 1975; REICHERT *et al.*, 2005). O uso terapêutico dos AMs

é talvez o primeiro exemplo claro de como o avanço das técnicas em imunologia, biotecnologia e biologia molecular vem proporcionando um conforto maior ao homem.

Ao final do ano de 2004 a Food and Drug Administration (FDA) havia aprovado 17 anticorpos com finalidades terapêuticas. O mercado para anticorpos monoclonais ainda se encontra na fase de formação e crescimento rápido. Estima-se que em 2008 os AMs movimentem aproximadamente US\$ 16,7 bilhões em vendas ao redor do mundo (PAVLOU *et al.*, 2005; REICHERT *et al.*, 2005). O alto valor agregado destes produtos que apresentam custo de aproximadamente US\$ 1 milhão por quilograma requer emprego de alta tecnologia de produção, a qual é necessariamente precedida de investimentos maciços em pesquisa com o fim de otimizar os bioprocessos de produção em larga escala.

Nos países desenvolvidos como EUA, Japão e vários países europeus já existem plantas industriais instaladas para produção de AMs. A engenharia de bioprocessos, à semelhança com o que aconteceu na metade do século passado com a industrialização dos processos de produção de antibióticos, ao tornar possível essa realidade através do projeto e da implementação dos bioprocessos teve que fazer uso de concepções modernas para atender às exigências éticas e tecnológicas altamente refinadas que são típicas dos cultivos de células animais. No Brasil, embora existam pesquisadores capazes de utilizar a tecnologia de fusão de células para obtenção de hibridomas, o domínio do conhecimento para desenvolvimento de bioprocessos para produção em larga escala de AMs por essas células é muito incipiente. Para colocar em prática um bioprocessos destes, é indispensável que se façam estudos técnico-econômicos prévios com o intuito de identificar as condições que conduzem a cultivos de alta produtividade, de baixo custo e com nível de biosegurança aceitável pelos órgãos reguladores (GÒDIA, *et al.*, 2002). Para atingir esse complexo objetivo, uma das primeiras providências a ser tomada é a de realizar estudos em escala laboratorial que permitam avaliar as características cinéticas e fisiológica dos hibridomas em condições de cultivo semelhantes às

que serão posteriormente utilizadas em larga escala. As informações levantadas nesta etapa serão de crucial importância para o delineamento de um bioprocesso eficiente e econômico.

Desde a elucidação em 1900, pelo imunologista austríaco Karl Landsteiner, da existência de antígenos eritrocitários que formam atualmente a base do mais importante sistema de grupo sanguíneo existente no organismo humano, o sistema ABO, e da realização da primeira transfusão precedida de exame de compatibilidade ABO no ano de 1907 por Reuben Ottenberg que passou a ser utilizada, com maior intensidade, a partir da Primeira Guerra Mundial (1914-1918), a transfusão sanguínea adquiriu bases mais científicas. Assim, nos dias atuais, passou a ser prática obrigatória dos bancos de sangue realizar a tipagem sanguínea deste sistema em doadores e receptores de sangue bem como em situações de transplantes de órgãos.

São conhecidos diversos sistemas de grupos sanguíneos: sistemas ABO, Rh, MNS, Kell, Lewis dentre outros. O sistema ABO é o de maior importância na prática transfusional por ser o mais antigênico, ou seja, por ter maior capacidade de provocar a produção de anticorpos, seguido pelo sistema Rh. Os antígenos deste sistema estão presentes na maioria dos tecidos do organismo.

O estudo da compatibilidade sanguínea no sistema ABO, entre doador e receptor, é de grande importância, pois transfusões ou mesmo transplantes que não envolvam compatibilidade sanguínea podem culminar em grandes riscos de desenvolvimento de reações hemolíticas intravasculares que colocariam em risco a vida do paciente. Desta forma, o sistema ABO se reveste de interesse clínico, principalmente, nas práticas transfusionais e no campo dos transplantes de órgãos, democratizando um benefício trazido pela biotecnologia.

A determinação do grupo sanguíneo do sistema ABO é feita usando dois tipos de teste: através da identificação da presença de antígenos nos eritrócitos, usando reativos compostos de anticorpos conhecidos (anti-A, anti-B, anti-AB) que é chamada classificação ou

tipagem direta ou da identificação da presença de anticorpos no soro/plasma usando reativos compostos de antígenos conhecidos (hemácias A e hemácias B) que é chamada classificação ou tipagem reversa.

Hibridomas murinos capazes de secretar imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários do sistema sanguíneo ABO humano vêm sendo utilizados na redeterminação da tipagem sanguínea à beira do leito de pacientes prestes a receber transfusão sanguínea no hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu, SP sob a direção da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elenice Deffune com intuito de minimizar possíveis problemas que envolvam compatibilidade sanguínea. A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Deffune e sua equipe têm amplo domínio da técnica de desenvolvimento dos hibridomas para essa aplicação, porém os hibridomas são cultivados em frascos de cultura tendo como prioridade sua manutenção e não a produção em grandes quantidades.

Atualmente clones desses hibridomas estão sendo utilizados no Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular (LATECC) do DEQ/UFSCar em estudos preliminares para o desenvolvimento de um bioprocesso de produção de três AMs para tipagem sanguínea pelo sistema ABO. Contando com uma demanda nacional já quantificada, o interesse dos dois grupos de pesquisa se concentra atualmente na abordagem de estudos relativos à engenharia do bioprocesso. Embora existam dados na literatura especializada gerados nas última duas décadas para vários processos de cultivo de hibridomas em escala comercial (BACKER, *et al.*, 1987, NOE *et al.*, 1992, WERNER *et al.*, 1992, GRIFFITHS *et al.*, 1992, BIBILA *et al.*, 1995) é indispensável à geração de dados cinéticos e fisiológicos sobre as três linhagens de hibridomas que serão utilizados nesta pesquisa.

## **2 - OBJETIVO**

O presente trabalho tem como propósito o estudo das características metabólicas e cinéticas de três células de hibridomas murinos com o intuito de subsidiar o desenvolvimento do processo de cultivo em larga escala de produção de três imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários para uso hemoterápico na redeterminação da tipagem sanguínea pelo sistema ABO.

## **3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 - A CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

O cultivo de células animais teve início na última década do século XIX com a primeira tentativa de manter pedaços de tecidos em plasma ou fluido ascite por dias ou semanas, porém o sucesso foi limitado devido à qualidade do meio de cultura e pelas condições de esterilidade dos experimentos. Em 1907, Ross Harrison foi o primeiro a relatar a manutenção e crescimento de células do sistema nervoso em suspensão por um período de 30 dias (KRETZMER, *et al.*, 2002).

A cultura celular é designada como a cultura de células dispersa de um tecido e atualmente existem inúmeras técnicas para o cultivo de células onde, as usadas com maior frequência são as culturas em monocamada, culturas em suspensão e culturas em suspensão aderidas a partículas (microcarregadores). Culturas em monocamadas são culturas onde, durante a propagação celular, as células se aderem a uma superfície sólida sendo o meio que fornece as condições nutricionais para o crescimento celular um meio na forma líquida. Células em suspensão podem sobreviver e proliferar sem a necessidade de estarem aderidas a uma superfície. Atualmente, quando de posse de escolha, as culturas em suspensão é o

método mais adequado para aumento de escala devido às características de manipulação, menor custo, demanda de menor espaço além de permitir o monitoramento do crescimento celular e a facilidade do controle dos parâmetros de cultivo (FRESHNEY, 1994).

Com o advento da Engenharia Genética nos anos 1970s a capacidade da indústria biofarmacêutica expandiu amplamente. A aplicação bem sucedida da Tecnologia de Cultivo de Célula Animal para produção de proteínas terapêuticas tem despertado crescente interesse por parte das empresas biotecnológicas devido às várias vantagens que oferecem em comparação com sistemas derivados de células microbianas como, por exemplo, a produção de proteínas grandes e complexas, como enzimas e anticorpos monoclonais (PAVLOU *et al.*, 2004; PAVLOU *et al.*, 2005; REICHERT *et al.*, 2005).

Em 1975, nas dependências do UK's Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology em Cambridge os cientistas Köhler e Milstein conseguiram obter uma célula híbrida tumoral (Hibridoma), originária da fusão de um linfócito B normal com uma célula proveniente de um mieloma múltiplo. A célula híbrida apresentava, ao mesmo tempo, o caráter imortal da célula mielomatosa e a capacidade de fabricar anticorpos com a mesma especificidade que os fabricado pelo linfócito B normal. O Hibridoma constitui-se em uma verdadeira fábrica de anticorpos monoclonais. Através da divisão celular, a produção aumenta, estendendo-se através do tempo devido à imortalidade das células híbridas. Ambos os cientistas foram agraciados com o Premio Nobel de medicina em 1984 pelo desenvolvimento dos hibridomas (KOHLENER *et al.*, 1975).

Para se produzir um anticorpo monoclonal contra um determinado antígeno, inicialmente imuniza-se um animal, geralmente um camundongo, com esse antígeno. Em seguida, isolam-se células B do baço ou linfonodos desse animal. Estas células são misturadas com células de mieloma múltiplo, do tipo que não produz imunoglobulina e que não sobrevivem em determinados meios de cultura, como por exemplo, o meio HAT (meio de

cultura que requer a existência de enzimas capazes de metabolizar a hipoxantina ou a timidina, na presença de um antimetabólito, a aminopterina, para que a célula não morra). Essas células são então expostas ao polietilenoglicol, o que provoca sua fusão, formando-se então células híbridas.

Após 1 a 2 semanas, as células B do baço ou linfonodos, que não se fundiram, sofrem a esperada apoptose. As células mielomatosas que não se fundiram também morrem, por não possuírem as enzimas necessárias para a sobrevivência no meio de cultura na presença de aminopterina. As células híbridas, por obterem as enzimas das células normais e a imortalidade das células neoplásicas, são as únicas a persistirem no meio de cultura.

Então estas células são replicadas em placas de cultura, tentando-se colocar 1 célula em cada orifício. Elas irão se multiplicar, cada uma originando um clone de células híbridas, capazes de fabricar anticorpos com uma única especificidade. Através de métodos imunológicos a especificidade das imunoglobulinas presentes nos sobrenadantes pode ser testada, identificando-se os poços onde estão os hibridomas capazes de fabricar anticorpos contra o antígeno utilizado para imunizar o camundongo. Através de diversos repiques das culturas e inúmeros testes, chegamos à obtenção de uma população homogênea de células híbridas, capazes de serem mantidas e de replicarem em meio de cultura, que fabricam o anticorpo altamente específico desejado.

A Figura 3.1 ilustra as diferentes etapas a serem realizadas para a obtenção de um anticorpo monoclonal, desde a imunização do camundongo a obtenção da linhagem celular capaz de expressar a imunoglobulina de interesse.

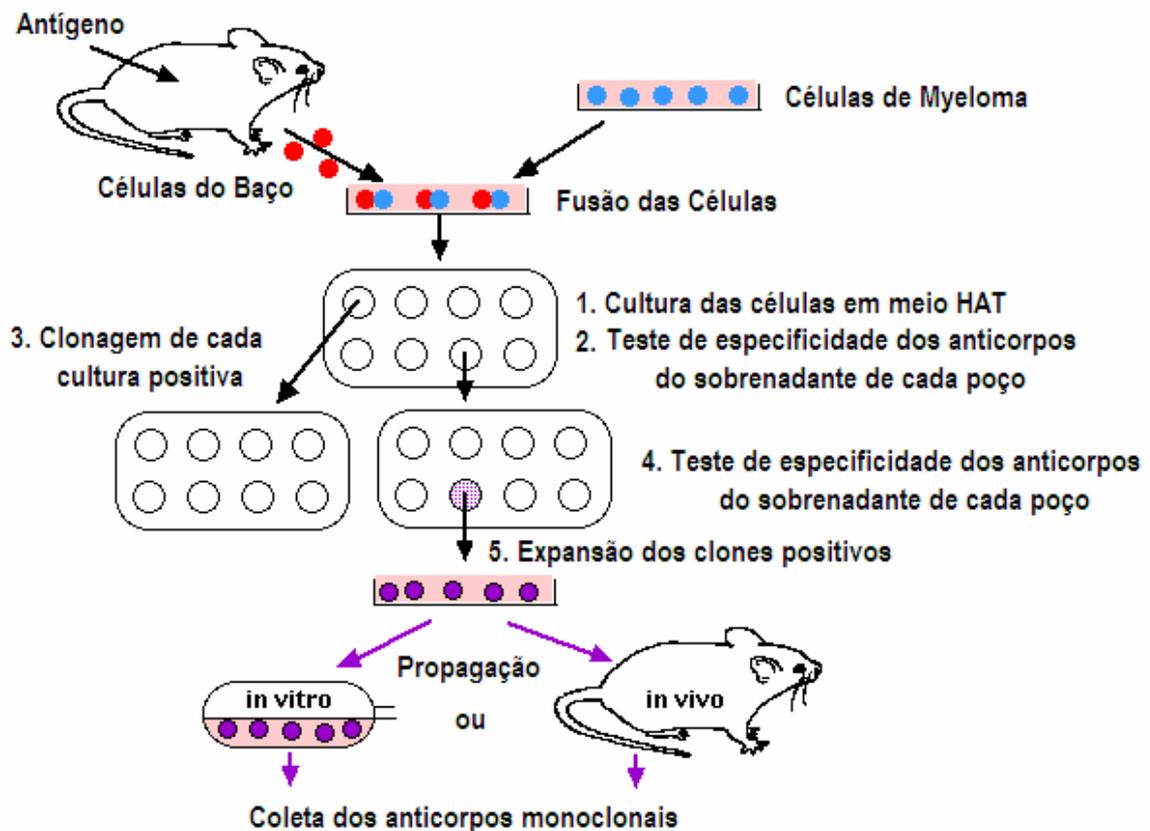


Figura 3.1 - Esquema ilustrativo de todas as etapas realizadas durante a obtenção de hibridomas.

Após a descoberta da técnica de produção de hibridomas, estudos visando aprimoramentos do cultivo destas células tem sido objeto de pesquisa em inúmeros laboratórios no mundo devido ao alto valor comercial do produto final e as inúmeras aplicações do produto que inclui desde testes clínicos, identificação de agentes infecciosos, identificação e quantificação de hormônios, tratamento de câncer, separação de compostos por coluna de separação, tipagem sanguínea dentre outras (LEIST *et al.*, 1990; ROUGER *et al.*, 1997; KRETZMER, *et al.*, 2002; PAVLOU *et al.*, 2005).

Dentre as inúmeras áreas de aplicação dos AMs podemos destacar alguns produtos licenciados: Daclizumab/Zenapax™, Basiliximab/Simulect™ (imunossupressão em operações de transplantes de órgãos), Rituximab/Rituxan™ (tratamento de células B em non-Hodgkin's linfoma), Trastuzumab/Herceptin™ (tratamento de metástase de mama),

Infliximab/Remicade™ (tratamento da doença de Crohn's) (CHU *et al.*, 2001; KRETZMER, *et al.*, 2002).

Contudo a cultura de células híbridas de mamíferos é ainda limitada em inúmeros aspectos. O tamanho celular e a ausência de parede celular rígida tornam estas células mais vulneráveis a ação mecânica comparada às células dos microrganismos. O uso de biorreatores na cultura de células de mamíferos tem permitido ótima relação entre o estresse mecânico e as características de transferência de massa bem como o controle de parâmetros dos processos biotecnológicas como temperatura e pH quando comparada às condições em frascos de cultura celular, frascos Schott e Spinner (SCHNEIDER *et al.*, 1996; CHU *et al.*, 2001; KRETZMER, *et al.*, 2002).

### **3.2 - OS ANTICORPOS MONOCLONAIS NA ATUALIDADE**

Após o advento da tecnologia para a produção de AMs descrita por Köhler e Milstein em 1975, esta técnica tem sido utilizada na produção de anticorpos contra inúmeros antígenos. No contexto das transfusões sanguíneas, a partir do final dos anos 70, tanto a Inglaterra quanto o Canadá produziram imunoglobulinas contra o sistema ABO, com características adequadas para a utilização na classificação eritrocitária. Desde então, os AMs tem sido progressivamente utilizados como reativos na hemoclassificação em substituição aos anticorpos policlonais antes utilizados para esta finalidade e estas imunoglobulinas tem sido produzidas em escala industrial com a conseqüente diminuição dos custos de produto final e maior disponibilização ao homem.

A metodologia da produção de AMs é dispendiosa, demandando muito tempo e é suscetível a influência por fatores extrínsecos como a contaminação por microrganismos ou ainda por fatores intrínsecos como respostas imunes aos antígenos produzidos pelas cobaias o que pode retardar a obtenção do produto desejado. O estudo das características de

crescimento e expressão do produto de uma linhagem celular normalmente é iniciado em pequenos frascos em escala laboratorial e após aquisição de dados necessários para aumento de escala estas linhagens são cultivadas em escalas maiores (KRETZMER, *et al.*, 2002).

Atualmente, utiliza-se uma grande variedade de antígenos para a produção de AMs com especificidade ao sistema sanguíneo ABO como: grupos eritrocitários específicos, membranas celulares de amídalas humanas, linhas de células de câncer de cólon humano, saliva humana, oligossacarídeos sintéticos dentre outros.

Após obtenção dos hibridomas, é necessário uma investigação criteriosa a fim de selecionar as células capazes de secretar os AMs com alta especificidade ao antígeno de interesse.

Os monoclonais são vendidos nos Estados Unidos desde 1978 e, no Brasil, desde meados dos anos 80, sobretudo como reagentes para diagnósticos.

A produção de hibridomas que secretam AMs com especificidade de ataque a proteínas de interesse está sendo vastamente utilizada em clínicas médicas e na indústria farmacêutica com inúmeras aplicações, desde para o diagnóstico e tratamento de certas doenças como câncer e artrite, doenças auto imune e inflamatórias como na purificação de substâncias de interesse científico e tecnológico (PAVLOU *et al.*, 2005).

Desta forma, a crescente demanda por AMs impulsiona e estimula a otimização dos processos de produção destas células. A concentração e evolução dos substratos e produtos é um fator chave para o conhecimento da cinética da cultura dos hibridomas, assim, a obtenção de parâmetros cinéticos que descrevam o crescimento celular, o consumo de nutrientes e a produção do produto desejado são de grande valor para o aperfeiçoamento do bioprocessamento de cultivo destas células. Estes parâmetros poderão ser muito utilizados para projetar e avaliar os processos de produção em alta escala (LEGAZPI *et al.*, 2005).

### 3.3 - OS PRINCIPAIS SUBSTRATOS NECESSÁRIOS NO CULTIVO

O esgotamento dos nutrientes necessários para o perfeito crescimento celular durante o cultivo tipicamente resulta na diminuição da concentração celular no cultivo (JO *et al.*, 1993). A suplementação do meio de cultura com os substratos exauridos devido às necessidades de cada linhagem celular em estudo é importante por promover maior densidade celular no cultivo e maior rendimento do produto desejado (DUVAL *et al.*, 1991; SANFELIU *et al.*, 1996).

Em linhagens de células híbridas geralmente o consumo de glicose e glutamina ocorrem de forma diferenciada em comparação com células normais e geralmente as células híbridas apresentam altas velocidades de consumo destes nutrientes. Como consequência, estas linhagens geralmente apresentam uma pobre exploração destas fontes de energia e produzem grandes quantidades de ácido láctico e íon amônio que são metabólitos tóxicos (substâncias indesejadas ao cultivo celular) (SANFELIU *et al.*, 1997).

O açúcar D-Glicose e o aminoácido L-Glutamina são as principais fontes de carbono e energia para as células dos hibridomas. Parte do metabolismo da L-Glutamina é responsável pela produção de glutamato e íons amônio, já o metabolismo da glicose produz entre outros lactato. Entretanto, L-Glutamina e D-Glicose são nutrientes fundamentais para o perfeito desenvolvimento da cultura de hibridomas, porém íons amônio e lactato são produtos do metabolismo celular que podem atuar como inibidores quando suas concentrações alcançarem valores altos para a cultura (GLACKEN *et al.*, 1986; MILLER *et al.*, 1988; GAMBHIR *et al.*, 1999; LEGAZPI *et al.*, 2005).

O aminoácido L-Glutamina pode ser catabolizado por três caminhos diferentes. O primeiro é a completa oxidação através do ciclo do ácido cítrico. O segundo é a oxidação parcial até lactato, o último é outra oxidação parcial produzindo aspartato pela aspartase

aminotransferase ou produzindo alanina pela alanina aminotransferase. Respectivamente, 24-27, 6-9 e 9 mols de adenosina trifosfato (ATP) são produzidos por mol de L-Glutamina usada (JEONG *et al.*, 1995). Já a D-Glicose é metabolizada até piruvato via glicólise. Se a molécula de piruvato é reduzida a lactato somente 2 moles de ATP são produzidos por mol de D-Glicose catabolizado. Alternativamente, piruvato pode entrar no ciclo de Krebs via acetil CoA produzindo 36 moles de ATP por mol de glicose catabolizado (GLACKEN *et al.*, 1986).

Alguns autores observaram que a concentração de D-Glicose no meio de cultura regula inversamente o metabolismo da L-Glutamina. O aumento da concentração de D-Glicose reduz o consumo de L-Glutamina e a diminuição da concentração de D-Glicose ou a substituição da D-Glicose por outros açúcares como frutose ou galactose estimula o consumo de L-Glutamina. Também, altas concentrações de L-Glutamina aumentam a taxa de consumo específico deste substrato (MILLER *et al.*, 1988; JEONG *et al.*, 1995).

As limitações estequiométricas relacionadas à concentração de L-Glutamina foram alcançadas em valores que variam de concentrações menores que 1-2 mM de L-Glutamina (JEONG *et al.*, 1995). Outro fator importante é que a diminuição da concentração de L-Glutamina no meio de cultura tem um efeito muito significativo na morte celular, assim, manter a concentração deste aminoácido em níveis apropriados durante o período de cultura é uma importante estratégia para aumentar a viabilidade celular e a produção de anticorpos (MILLER *et al.*, 1988; JEONG *et al.*, 1995).

No decorrer da evolução as células eucarióticas superiores perderam a capacidade de sintetizar uma série de aminoácidos. Tais aminoácidos são geralmente designados por aminoácidos essenciais, enquanto aqueles que as células possuem capacidade de sintetizar são chamados de aminoácidos não essenciais. Entretanto, a forma como estes aminoácidos são designados pode ser considerada equivocada, pois alguns aminoácidos não essenciais são, na verdade, necessários para síntese de nucleotídeos (L-Aspartato e L-

Glutamina) e também a capacidade de síntese pode ser condicional, dependendo da situação nutricional, do status proliferativo e das propriedades específicas das células.

O aminoácido L-Cisteína é um aminoácido não essencial capaz de ser sintetizado por células normais e é muito importante para algumas linhagens de hibridomas. Tem sido relatado que este aminoácido é o primeiro aminoácido a ser totalmente esgotado para algumas linhagens de hibridomas e esta exaustão é responsável pela inibição do crescimento celular (SANFELIU *et al.*, 1996; LAMBERT *et al.*, 1975; JO *et al.*, 1990; DUVAL *et al.*, 1991).

É necessário enfatizar que muitos dos trabalhos realizados com AMs tem sido desenvolvidos utilizando-se meio de cultura enriquecido com componentes de origem humana ou animal como soro fetal bovino (SFB) pois sabe-se que este soro contém fatores de crescimento celular, lipídios, sais minerais, proteínas de transporte de hormônios e outras moléculas que favorecem o crescimento de hibridomas (CHUCK *et al.*, 1992; SANFELIU *et al.*, 1996). Algumas desvantagens do uso de SFB são: o alto custo do reagente, a falta de homogeneidade entre os lotes, a preocupação com possíveis agentes contaminantes no soro como a presença de formas especiais de proteínas chamadas príon que são responsáveis pela encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca que provoca degeneração cerebral) e de Bovine Viral Diarrhea Vírus (BVDV) além da grande presença de proteínas que dificultam a purificação do produto desejado. Por estas razões o soro tem sido substituído por aditivos como sais inorgânicos de ferro (LEGAZPI *et al.*, 2005).

Os problemas com o uso de meio de cultura livre de SFB surgem do não conhecimento total das necessidades nutricionais das linhagens celulares e conseqüentemente é impossível providenciar todos os componentes necessários em um meio quimicamente definido. As condições de crescimento das linhagens celulares tornam-se mais críticas na ausência de SFB onde podemos destacar a fragilidade a menores variações no valor do pH do

meio de cultivo toleradas pelas células. Outros inconvenientes incluem a perda do efeito de proteção que é exercido pelo SFB contra as forças de cisalhamento, a exigência de reagentes de melhor qualidade e os longos tempos de adaptação ao crescimento na ausência de SFB para algumas linhagens celulares.

A suplementação do meio de cultura com os nutrientes identificados como limitantes ao cultivo celular deve ser realizada de forma a não alterar a osmolalidade do meio e a solubilidade dos reagentes garantindo assim perfeita proliferação da cultura.

### **3.4 - ACÚMULO DE METABÓLITOS**

A morte celular é um processo fisiológico normal e totalmente regulado. A morte é patológica ou "acidental" quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como variações de temperatura do cultivo, traumas físicos, produtos tóxicos (lactato e íon amônio) e falta de oxigênio. As lesões podem ter ainda origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus. Esse tipo de morte celular é chamado de necrose.

A necrose é claramente visível por microscopia eletrônica: a célula incha e as organelas do citoplasma, em particular as mitocôndrias, são danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Tais lesões impedem o controle do equilíbrio interno: a água e alguns íons (em especial sódio e cálcio), normalmente bombeados para fora, fluem livremente para dentro da célula, que incha e se rompe. A ruptura libera no tecido vizinho o conteúdo celular, rico em proteases e outras substâncias tóxicas capazes de comprometer as condições ideais para a manutenção do cultivo.

O termo apoptose foi criado para descrever somente as mudanças morfológicas que ocorrem durante a morte celular. Durante a apoptose as células são encolhidas drasticamente, a membrana plasmática e o retículo endoplasmático formam

vacúolo, a cromatina é condensada ao longo da membrana nuclear, depois formam esferas, em formas crescentes. Subseqüentemente a célula é fragmentada em compactas estruturas membranosas chamadas de corpos apoptóticos.

O cultivo de células eucarióticas podem alcançar concentrações celulares entre  $1-2 \times 10^7$  por mL. Dois fatores que podem limitar a densidade celular são a diminuição de nutrientes essenciais para o crescimento celular e o acúmulo de substâncias tóxicas capazes de inibir o crescimento celular no meio de cultivo (CAPIAUMONT *et al.*, 1995; OZTUR *et al.*, 1992; DUVAL *et al.*, 1992).

Muitos metabólitos têm sido citados como tóxicos para cultura de células de mamíferos sendo inibidores de crescimento celular e redutores da síntese de produtos. Os mais importantes metabólitos mencionados neste contexto são íon amônio e lactato (GLACKEN *et al.*, 1986; HU *et al.*, 1987; CAPIAUMONT *et al.*, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 1996).

O lactato pode ser formado pela oxidação incompleta da D-Glicose bem como outros açúcares e aminoácidos como a L-Glutamina. A ação tóxica do acúmulo de lactato é devida ao efeito da diminuição do pH e aumento da osmolalidade do meio de cultura. Concentrações altas de lactato (20-60 mM dependendo da linhagem de células em estudo) se tornam indesejáveis ao cultivo devido afetar as condições de metabolismo e fisiologia celular além da diminuição da viabilidade celular (OZTURK *et al.*, 1992; OMASA *et al.*, 1992; SCHNEIDER *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2004).

A formação de lactato durante o cultivo celular, segundo LUAN *et al.* (1987c), esta diretamente ligada com a concentração inicial do açúcar D-Glicose no meio de cultura e a velocidade de crescimento celular. Segundo os autores, altas concentrações iniciais de D-Glicose conduzem a altas taxas de formação de lactato durante a fase de crescimento exponencial.

Em concentrações menores que 0,1 mM de L-Glutamina a taxa de produção específica de lactato não é alta porém a taxa de consumo específica de D-Glicose é alta. Este fato pode ser explicado pela necessidade imediata de energia das células, assim, elas convertem D-Glicose pelo caminho mais eficiente de produção de ATP (JEONG *et al.*, 1995).

A inibição pela amônia apresenta um papel mais importante por caracterizar um metabólito mais tóxico que o lactato. Concentrações totais de amônia e íons amônio entre 2-3 mM tem sido relatadas como prejudiciais por reduzir consideravelmente o crescimento celular dependendo da linhagem celular e as condições de trabalho (McQUEEN *et al.*, 1990; NEWLAND *et al.*, 1990; OZTURK *et al.*, 1992; NEWLAND *et al.*, 1994; CAPIAUMONT *et al.*, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 1996).

A amônia provém do metabolismo de aminoácidos, principalmente da L-Glutamina, porém este aminoácido não essencial é rotineiramente adicionado ao meio de cultivo em concentrações que variam de 2-5 mM por estimular o crescimento celular e a produção de anticorpos. Além de participar da biossíntese da purina e pirimidina, a L-Glutamina é uma excelente fonte de energia, entretanto é um composto instável e decompõe-se na presença de luz e em temperatura acima de 37° C em amônia e ácido pirrolidone-carboxílico por S<sub>N</sub>2 intramolecular. Concentrações de ácido pirrolidone-carboxílico acima de 20 mM não tem afetado o crescimento de hibridomas murinos. O catabolismo completo da L-Glutamina produz dois mols de amônia por mol de L-Glutamina. Consequentemente, o acúmulo de amônia no meio de cultivo não é devido somente ao metabolismo celular, mas a decomposição química da L-Glutamina e a presença de aproximadamente 0,5 mM de NH<sub>4</sub>OH no soro fetal bovino (SFB) utilizado no cultivo de algumas células eucarióticas (CAPIAUMONT *et al.*, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 1996).

Assim, a redução dos metabólitos que se demonstram como substâncias tóxicas é de fundamental importância na otimização do cultivo de células de mamíferos (SCHNEIDER *et al.*, 1996).

### **3.5 - ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DE METABÓLITOS TÓXICOS**

As medidas utilizadas na redução de amônia em cultura de células animais têm enfatizado a decomposição da L-Glutamina no meio e com maior importância a formação de amônia devido ao metabolismo dos aminoácidos, principalmente a L-Glutamina sendo as principais fontes geradoras de amônia (SCHNEIDER *et al.*, 1996).

A produção do íon amônio é estimulada pelos altos níveis de L-Glutamina no meio de cultura e a diminuição da concentração de L-Glutamina pode reduzir a produção do íon amônio (JEONG *et al.*, 1995).

Alguns autores sugerem a substituição da L-Glutamina por glutamato no intuito de diminuir a concentração de amônia gerada pelo metabolismo da L-Glutamina, contudo é necessário certificar que a linhagem de células em cultivo possui todo o arcabouço enzimático necessário para o metabolismo na ausência de L-Glutamina.

CAPIAUMONT *et al.* (1995) observaram que a L-Glutamina é essencial para o crescimento celular e não pode ser completamente substituída por glutamato, pois este possui ineficiente transporte através das membranas celulares principalmente através da membrana mitocondrial. Também é possível que a glutamina sintetase enzima necessária por converter glutamato em glutamina necessária para a síntese de alguns ácidos nucleicos pode ser defeituosa em algumas linhagens de hibridomas. Experimentos conduzidos com uso de resinas que permitiram a diminuição da concentração de amônia no meio de cultivo ocasionaram aumento da densidade celular no cultivo, no entanto houve pequeno aumento na produção de anticorpo.

TAKAGI *et al.* (1995) observaram que o aumento da pressão hidrostática na cultura de um hibridoma murino (AFP-27) ocasionou pequena variação no crescimento celular e na taxa de consumo de D-Glicose, porém observou uma diminuição na taxa de conversão de D-Glicose em lactato como efeito do aumento da pressão hidrostática na fase de manutenção celular. Contudo o aumento da pressão hidrostática proporcionou aumento da taxa de consumo específico de L-Glutamina, na taxa de produção específica de amônia e na taxa de produção específica de anticorpos tanto na fase de crescimento celular quanto na fase de manutenção celular.

### **3.6 - OXIGÊNIO E OUTROS GASES NO CULTIVO**

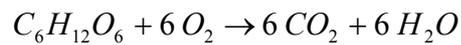
A importância da presença de oxigênio em quantidades que satisfaçam a demanda deste gás pela linhagem de células em cultivo é fundamental para o crescimento celular, pois a obtenção de energia em grandes quantidades ocorre através da respiração celular realizada pelas células eucarióticas além da necessidade do oxigênio em algumas reações de biossíntese.

No metabolismo celular, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons na cadeia respiratória, sendo então reduzido à água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise e do ciclo de Krebs, bem como a estocagem de energia através da transformação das moléculas de ADP em moléculas de ATP, fundamentais para o funcionamento da máquina celular (manutenção, crescimento, síntese de produtos, transporte ativo entre outros).

Ao se objetivar cultivos com elevadas velocidades de crescimento celular, o que significa altas velocidades de consumo de fontes de carbono, a fim de que ocorra a abundância de elétrons na cadeia respiratória e geração de ATP deverá haver também,

necessariamente, quantidade suficiente de oxigênio dissolvido para que estes elétrons possam ser drenados ao final da cadeia respiratória.

A equação estequiométrica de oxidação completa da glicose ilustra bem esta situação:



Assim, para que ocorra a oxidação de 1 mol de glicose, é necessário o consumo de 6 moles de  $O_2$ .

Desta forma o oxigênio deve ser considerado um nutriente semelhante a outros dissolvidos no meio de cultura tais como glicose e aminoácidos. Existe, porém, uma diferença, a solubilidade do oxigênio é extremamente baixa quando comparada a de outros nutrientes. Por exemplo, num meio de cultivo, nutrientes dissolvidos tal como a glicose, podem ser mantidos em concentrações muito maiores que  $10.000 \text{ mg.L}^{-1}$ , já o oxigênio, em condições normais de cultivo, apresenta solubilidade geralmente inferior a  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Por esta razão, torna-se necessário suprir continuamente o meio de cultura com oxigênio para assegurar a demanda metabólica da célula.

SANFELIU *et al.* (1996) observaram que a quantidade de lactato produzido aumenta com a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Uma forma de superar a limitação do crescimento celular pela falta de oxigênio dissolvido no meio e também a formação de bolhas produzidas por alguns impelidores seria o uso de aeração indireta com uso de membrana de silicone onde a suplementação de oxigênio é dada pela difusão do gás pela membrana e desta forma nenhuma bolha é formada (KRETZMER *et al.*, 2002).

A pressão parcial de gás carbônico ( $CO_2$ ) pode alcançar valores altos em reatores de escala industrial e este aumento da pressão parcial de  $CO_2$  pode significativamente inibir o crescimento celular e a expressão do produto desejado. O  $CO_2$  é produzido via

reações catabólicas e é necessário para a síntese de pirimidinas, purinas e alguns ácidos. O  $\text{CO}_2$  dissolvido é hidratado e está em equilíbrio com  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  de acordo com a equação química abaixo:



A inibição por  $\text{CO}_2$  é devida em parte à acidificação do meio se o pH não está controlado pela adição de base. Se o pH é controlado há um favorecimento do deslocamento do equilíbrio da reação para a direita por um tempo maior o que provoca um aumento da osmolalidade. Uma prematura morte celular foi observada no cultivo de células de mielomas NS/0 com uma  $\text{pCO}_2$  de 120 mm Hg, porém não foram observadas mudanças na taxa de produção específica destas células (DEZENGOTITA *et al.*, 1998).

Um possível mecanismo através do qual  $\text{CO}_2$  pode afetar o crescimento e metabolismo celular é através de mudanças no pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ), que afeta a atividade de várias enzimas envolvidas no metabolismo e produção de proteínas.  $\text{CO}_2$  é um gás que difunde facilmente através da membrana celular, assim,  $\text{pCO}_2$  no interior celular é bastante parecido com  $\text{pCO}_2$  no meio. Uma vez no interior celular o  $\text{CO}_2$  estabelece equilíbrio com  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  o que ocasiona uma diminuição do  $\text{pH}_i$  em resposta de um aumento da  $\text{pCO}_2$  (DEZENGOTITA *et al.*, 1998).

Mecanismo de morte celular por apoptose foi identificado em cultivos em modo de operação em batelada em  $\text{pCO}_2$  140 mm Hg e 370 mOsm  $\text{Kg}^{-1}$  (DEZENGOTITA *et al.*, 1998).

### 3.7 - INFLUÊNCIA DO pH NO CULTIVO CELULAR

O crescimento e metabolismo das células de mamíferos são extremamente influenciados por pequenas variações no pH ótimo do meio de cultura onde a produção de

lactato é apontada como o principal responsável pela acidificação do meio de cultura devido à perda de capacidade de tamponamento (GLACKEN *et al.*, 1986). OZTURK *et al.*(1991, 1992) encontraram que a taxa de crescimento de hibridomas foi ótima em pH 7.2, porém a taxa de produção específica de anticorpos aumentou duas vezes em valores menores de pH. Eles também encontraram que a taxa de consumo de glicose e glutamina e a taxa de produção de lactato e amônia aumentaram em elevados valores de pH.

Segundo MUSGROVE *et al.* (1987) os hibridomas são muito sensíveis a variações de pH e são capazes de manter o pH intracelular em valores controlados mesmo o pH extracelular estando em valores próximos a 6,5. Entretanto valores de pH extracelulares abaixo de 6,5 proporciona a acidificação do meio intracelular conduzindo a morte ou estado de repouso das células.

A morte celular libera uma variedade de enzimas e DNA celular no sobrenadante de cultivo que podem alterar a qualidade do produto desejado (KRETZMER, *et al.*, 2002). Valores de pH podem influenciar também nas características do produto principalmente na glicosilação.

Segundo DOYLE *et al.* (1990) a inibição do crescimento celular mediada pelo íon amônio varia com o pH do meio de cultura.

### **3.8 - EFEITOS DA AGITAÇÃO NO CULTIVO**

Com respeito às condições de cultura, as culturas de hibridomas têm sido realizadas em frascos estáticos, entretanto muitos autores têm descrito a influência da agitação no crescimento dos hibridomas. A agitação da cultura favorece o transporte de nutrientes e oxigênio em direção às células além de remover CO<sub>2</sub> de forma mais eficiente que em culturas estáticas, entretanto a ausência de uma parede celular resistente a choques mecânicos torna estas células mais frágeis ao estresse mecânico e ao fenômeno da cavitação (LEGAZPI *et al.*,

2005). Alguns autores têm estudado a proteção contra esses distúrbios e tem apontado o SFB e surfactantes como aditivos que minimizam o estresse provocado pela agitação.

O surfactante Pluronic F-68 é um bloco bifuncional copolimérico (poly[oxietileno-co-oxipropileno]) surfactante terminado em grupos hidroxilas primárias, funcionando como um surfactante não iônico. É largamente utilizado em culturas de células como protetor contra o cisalhamento, por possuir propriedades de reação com a membrana tornando-as mais resistentes e sem alterar significativamente a viscosidade do meio de cultura.

Os hibridomas são capazes de crescer em suspensão e como este tipo de configuração é o mais apropriado em termos de confiabilidade e possibilidade de aumentos de escala, os hibridomas podem ser cultivados em biorreatores agitados em diversos modos de operação, a ser escolhido com base na caracterização dos parâmetros cinéticos de cada linhagem celular em estudo. Também se faz necessário, no desenvolvimento de um processo com biorreator, combinar as condições de velocidade de agitação à oxigenação no intuito de encontrar as condições hidrodinâmicas mais adequadas ao cultivo.

### **3.9 - A EXPRESSÃO DAS IMUNOGLOBULINAS**

Os anticorpos são proteínas complexas usadas pelo sistema imune para identificar e neutralizar estruturas estranhas como bactérias e vírus. Cada anticorpo reconhece um antígeno específico. Anticorpos são glicoproteínas encontradas no sangue e fluidos de tecidos e são de forma estrutural conhecidos como imunoglobulinas. Eles são sintetizados e secretados pelas células B do sistema imune que são ativadas pela presença de antígenos no sangue. Os anticorpos possuem a forma de “Y” e as duas alças superiores são conhecidas como variáveis de ligação a antígenos.

As imunoglobulinas estão agrupadas em cinco classes ou isótipos: *IgG*, *IgA*, *IgM*, *IgD* e *IgE*. Diferenças no domínio constante da cadeia pesada determinam a função e a qual classes elas pertencem.

*IgG* é uma imunoglobulina que está presente no sangue normal em grandes proporções. Esta imunoglobulina pode reconhecer e atacar inúmeros tipos de patógenos como, por exemplo, vírus, bactérias e toxinas produzidas por fungos. Existem 4 subclasses da imunoglobulina *IgG*: *IgG1*, *IgG2*, *IgG3* e *IgG4*.

As imunoglobulinas *IgA* representam aproximadamente entre 15 a 20 % das imunoglobulinas do sangue e são primariamente secretadas no trato da mucosa entre o estômago e o intestino. Esta imunoglobulina ajuda a combater patógenos ingeridos, inalados ou que aderem à superfície do corpo. Ela existe em duas formas: *IgA1* e *IgA2*.

*IgM* é uma imunoglobulina que consegue classificar o sangue humano segundo o sistema sanguíneo ABO. É também importante no combate a bactérias. Junto com *IgA*, *IgM* é capaz de formar polímeros onde múltiplas imunoglobulinas são covalentemente ligadas. *IgA* pode polimerizar em dímeros enquanto a *IgM* é encontrada com um pentâmero ou hexâmero. Um pequeno peptídeo conhecido como corrente J está ligado em muitos pentâmeros enquanto hexâmeros não possuem a corrente J devido à limitação de espaço no complexo. Devido a estes polímeros naturais, *IgM* possui alta avidéz e é particularmente efetiva na ativação de proteínas responsáveis pela defesa contra organismos invasores.

As imunoglobulinas *IgD* constituem aproximadamente 1 % das membranas dos linfócitos B no plasma. Estas imunoglobulinas estão envolvidas no desenvolvimento de células de memória.

*IgE* é uma imunoglobulina que pode ser encontrada na superfície da membrana de basófilos. Esta imunoglobulina está envolvida com doenças como hipersensibilidade e na defesa de parasitas como os vermes.

As imunoglobulinas constituem as proteínas pesadas do plasma. Frequentemente possuem açúcares adicionados (glicosilação) na cadeia N-terminal (todos os anticorpos) e ocasionalmente na cadeia O-terminal (IgA1 e IgD) de seus resíduos de aminoácidos.

Para se proteger de muitos antígenos o sistema imunológico produz milhões de anticorpos específicos, cada um diferenciando na porção que detecta e ataca os antígenos.

Muitos autores têm demonstrado que a síntese para a obtenção de AMs se torna mais eficiente quando os hibridomas se encontram em estado estacionário do cultivo (fase onde a concentração total de células permanece constante). É sugerido que quando baixas concentrações de glutamina estão disponíveis, as células fazem uso preferencialmente deste aminoácido para sintetizar anticorpos do que para divisão celular (DEZENGOTITA *et al.*, 1998).

Já o aumento da concentração de glutamina no meio de cultura durante o cultivo estimula o crescimento celular e a viabilidade celular além de aumentar a taxa de produção específica dos anticorpos (JEONG *et al.*, 1995).

DEZENGOTITA *et al.* (1998) relataram que a taxa de produção específica de anticorpos foi elevada de aproximadamente 70 % em elevadas pCO<sub>2</sub>, porém os efeitos do aumento da pCO<sub>2</sub> é ainda confuso pois não se sabe se as células passam a aumentar a produtividade específica de proteínas ou se o aumento da pCO<sub>2</sub> exerce um papel de expulsar as proteínas intracelulares presentes no citoplasma.

O aumento da densidade de células viáveis e o prolongamento do tempo de cultivo resultam em um aumento do valor da integral da densidade de células viáveis em função do tempo que é conhecido como Índice de Viabilidade (ID) e permite estimar a otimização de produção de AMs (ZHANG *et al.*, 2004).

LUAN *et al.* (1987a), LUAN *et al.* (1987b) e ZHANG *et al.*, (2004) demonstraram que para a maximização de produção de AMs é imprescindível, além de bom crescimento celular durante o cultivo, manter as células em estado viável após a fase de crescimento exponencial ou seja aumentar a longevidade do cultivo celular em função do tempo quando o cultivo atinge a fase estacionária. Os autores propuseram uma variável conhecida como Índice de Viabilidade para avaliação do parâmetro. Tal observação remete ao fato que neste período o cultivo dispõe do maior número de células aptas a produção de AMs sem necessitar de dispendiosa demanda de substratos como acontece na fase de crescimento exponencial o que também proporciona menor geração de metabólitos tóxicos devido ao menor consumo específico de glicose e glutamina o que é elucidado pelo consumo de substratos apenas para manutenção e biossíntese de AMs nesta fase.

### **3.10 – CULTIVO DE HIBRIDOMAS EM DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO**

Um dos interesses centrais do estudo do cultivo celular é, sem dúvida, a otimização da produção da proteína de interesse. Assim, o desenvolvimento de linhagens celulares que apresentam bom crescimento e produtividade, a maximização da longevidade do cultivo celular, a minimização da produção de metabólitos tóxicos e o controle das condições de desenvolvimento do cultivo são questões cruciais para se obter êxito no trabalho (GOERGEN *et al.*, 1992; BIBILA *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2004).

SANFELIU *et al.* (1997) observaram que o conhecimento da fisiologia e metabolismo dos hibridomas contribui para o desenvolvimento e otimização do processo de cultura celular. Tal conhecimento contribui para otimizar o meio de cultura, as estratégias de operação e um melhor conhecimento de quais são os principais substratos ou metabólitos que

necessitam ser monitorados e controlados no meio de cultura durante o processo para obtenção de bom crescimento celular e rendimento do produto.

Nos processos em batelada, todos os nutrientes necessários para o crescimento celular e formação de produto estão presentes no meio de cultura prévio para o cultivo. O oxigênio geralmente é suplementado por aeração. O cessar do crescimento da cultura geralmente reflete a exaustão dos substratos limitantes no meio. Nos processos em batelada alimentada um ou mais nutrientes são adicionados continuamente ou intermitentemente no meio de cultura após iniciado o cultivo evitando assim a inibição do crescimento por exaustão de substrato. Nos processos contínuos o meio de cultura contendo todos os nutrientes para o crescimento da cultura é constantemente adicionado em uma taxa constante a um reator e o meio de cultivo é simultaneamente removido na mesma taxa de alimentação. A Figura 3.2 ilustra os modos de operação em batelada, batelada alimentada e contínuo.

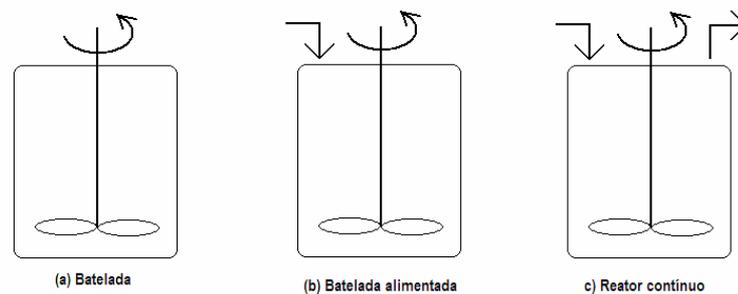


Figura 3.2 – Representação de modo de operação em batelada (a), modo de operação em batelada alimentada (b), modo de operação contínuo (c).

O modo de operação em batelada alimentada atualmente representa a escolha mais atrativa para produção de AMs em larga escala devido a simplicidade operacional, segurança e flexibilidade na implementação de instrumentos além de permitir a redução de formação de subprodutos, manter o balanço e a estabilidade da concentração dos nutrientes e das condições físicas como pH, temperatura e oxigênio dissolvido (BIBILA *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2004). SANFELIU *et al.* (1996) obtiveram excelentes resultados operando em batelada alimentada após identificação dos substratos e metabólitos limitantes ao crescimento

celular. O modo de operação em batelada alimentada permite combinar nutrientes chaves e adicioná-los de forma simultânea permitindo assim obtenção de melhores resultados.

A maximização da longevidade das células em cultura celular em modo de operação em batelada alimentada é alcançada através da suplementação periódica da cultura com nutrientes que são rapidamente consumidos ou exauridos do meio de cultivo e da identificação, através de análises, dos nutrientes limitantes e resíduos tóxicos. O uso de baixas concentrações de oxigênio dissolvido no meio de cultura (REUVENY *et al.*, 1986; PHILLIPS *et al.*, 1997), baixos valores de pH (HAYTER *et al.*, 1992), temperatura menores que 37 °C e variação da osmolaridade do meio de cultura (OZTURK *et al.*, 1991) também têm demonstrado em algumas linhagens de hibridomas prolongar a longevidade celular e aumentar o título final de AMs e portanto devem ser considerados no desenvolvimento do projeto de operações em batelada alimentada (BIBILA *et al.*, 1995).

ZHANG *et al.* (2004) observam que o desenvolvimento de um meio de cultura ideal para o crescimento da linhagem de célula de interesse e o conhecimento da velocidade específica de consumo de cada nutriente são questões chaves para alcançar êxito no processo.

Para a cultura de células de animais e consecutiva produção de proteínas os modos de operação em processo contínuos podem oferecer inúmeras vantagens em relação ao tradicional modo de operação em batelada: aumento da densidade celular e da concentração de proteínas, além de baixo consumo de nutrientes (GOERGEN *et al.*, 1992). Porém FRAME *et al.* (1990), OZTURK *et al.* (1990a) e OZTURK *et al.* (1990b) observaram diferenças significantes na morfologia e fisiologia celular que proporcionaram mudanças na cinética celular em culturas de células que foram mantidas em condições de crescimento limitado por extensos períodos de tempo como acontece em processos contínuos. FRAME *et al.* (1990) observaram reduções na síntese de proteínas em culturas contínuas devido a alterações genéticas ou seleção de populações incapazes de produzir a proteína de interesse.

GÒDIA *et al.* (2002) observaram que além de progressos nos modos de operação no cultivo de células de mamíferos é importante estender as pesquisas para o campo da engenharia metabólica e engenharia molecular, pois a combinação destas ciências pode conduzir a progressos mais significativos.

O uso da reposição de nutrientes que vão se exaurindo do meio de cultivo possibilita o aumento da produtividade volumétrica ou por aumentar a densidade celular no cultivo ou por aumentar a produtividade específica (KUNDU, *et al.*, 1998). O cultivo em suspensão em modo de operação batelada tem se tornado menos comum devido ao fato de alimentação de nutrientes de forma adequada (modo de operação batelada alimentada) pode reduzir o acúmulo de substâncias tóxicas e a oscilação de nutrientes permitindo assim atingir altas densidades celulares e alcançando excelentes produtividades (CHU *et al.*, 2001; KRETZMER, *et al.*, 2002; MARTIN, *et al.*, 2005).

Muitos trabalhos tem sido realizados em modo de operação batelada e batelada alimentada, obtendo consideráveis aumento no crescimento celular e produção de AMs e o modo de operação em batelada alimentada têm sido descrito como a escolha mais atrativa para a produção de AMs em larga escala (LUAN, *et al.*, 1987 b; EUI-CHEOL *et al.*, 1993; XIE *et al.*, 1994; BIBILA *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 1995).

### **3.11 – COMENTÁRIOS FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A análise da literatura mostrou que a tecnologia de cultivo de hibridomas para a produção de MABs é um campo que tem se desenvolvido nos últimos 20 anos e ainda continua a crescer. Também evidencia que a geração de conhecimento para a otimização de bioprocessos de cultivo em larga escala de novas linhagens de hibridomas demanda estudos bem elucidativos sobre as características fisiológicas e de crescimento celular.

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

Fazendo-se uma abordagem geral deste trabalho pode-se dizer que se trata de uma pesquisa em laboratório eminentemente experimental na qual serão estudadas algumas características cinéticas e fisiológicas de três hibridomas murinos para que possam ser usadas de forma confiável na passagem do processo de cultivo em escala de laboratório para o de escala de planta piloto e, eventualmente, para o de escala industrial. Os materiais e métodos a serem utilizados nesta pesquisa serão detalhados nos próximos parágrafos.

### **4.1 - MATERIAIS**

#### **4.1.1 - LINHAGENS DE HIBRIDOMAS**

Foram utilizadas três linhagens de hibridomas murinos produtoras de imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários do sistema sanguíneo ABO:

1 - Hibridomas ED7-183A12 produtora de imunoglobulina com especificidade a antígenos eritrocitários A (anti-A);

2 - Hibridoma murino NAKA4-56A137 produtora de imunoglobulina com especificidade a antígenos eritrocitários B (anti-B);

3 - Hibridoma murino TAN1-112A18 produtora de imunoglobulina com especificidade a antígenos eritrocitários AB (anti-AB).

As linhagens dos hibridomas em estudo foram disponibilizadas pelo Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP).

#### 4.1.2 - MEIO DE CULTURA UTILIZADO

O meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO™) contendo concentrações que variaram de 20 -10 % v/v SFB foi utilizado no cultivo dos hibridomas murinos. A Tabela 4.1 fornece a composição do meio de cultura que foi utilizado durante os experimentos realizados.

**Tabela 4.1 – Composição do meio de cultura utilizado no cultivo dos hibridomas murinos.**

<b>Componente</b>	<b>Volume adicionado</b>
Meio RPMI 1640 em pó (GIBCO™)	10,4 g
Água Milli-Q	1000 mL
Solução de Glicose 30 % p/v	12 mL
Piruvato de Sódio	10,0 mL
L-Glutamina 200mM (GIBCO™)	10,0 mL
Antibiotic-Antimycotic (GIBCO™)	10,0 mL
Ácido Oxalacético	10,0 mL
Insulina	2,0 mL
Mercaptoetanol	1,0 mL
Solução aminoácidos essenciais (GIBCO™)	10,0 mL
Solução aminoácidos não essenciais (GIBCO™)	5,0 mL
Bicarbonato de Sódio (P.A)	2,0 g

#### 4.1.3 – CORANTES

Foi utilizada uma solução aquosa de 0,4% azul de Tripán (Trypan Blue, Sigma T-6146), como corante para o método de exclusão por corantes.

#### 4.1.4 – EQUIPAMENTOS

##### 4.1.4.1 – CÂMARA ASSÉPTICA

Foi utilizada câmara asséptica de fluxo laminar (Biological Safety Cabinet Baker Company (USA) SterilGARD®III Advance°, model SG403/SG603 – Class II biological

Safety Cabinet) contendo lâmpada germicida UV, em todas as etapas nas quais serão manipuladas as células. A câmara minimiza a possibilidade de contaminação e a presença de poeira, pela passagem constante de um fluxo laminar permitindo que haja uma maior segurança na manipulação das células.

#### **4.1.4.2 – CENTRÍFUGA**

Nos métodos de centrifugação foi utilizado Centrífuga Excelsa Baby I (FANEM®, modelo 206) e o cultivo foi realizado em incubadora de CO<sub>2</sub> (WATERJACKET CO<sub>2</sub> INCUBATORS, SHEL LAB, modelo 2323-2).

#### **4.1.4.3 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO**

A esterilização do meio de cultura foi obtida por filtração através de sistema de filtração com uso de membrana Millipore GS em éster de celulose, 0,22 µm de poro, 142 mm de diâmetro, branca, lisa.

#### **4.1.4.4 – MICROSCÓPIO**

Para os métodos de contagem celular em crescimento foi utilizado o microscópio de campo invertido da marca Olympus modelo CK30 lente de aumento de 20 X onde a amostra foi colocada numa Câmara de Neubauer (Improved Neubauer, altura 1/10 mm, Bright Line – BOECO, Alemanha) de volume pré-definido e a contagem manual foi realizada com auxílio de contador manual da marca IVO.

#### **4.1.4.5 – FRASCOS DE CULTURA E VIDRARIAS**

Foram utilizadas frascos de cultura celular (frascos T) de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> da marca Corning de poliestireno com superfície tratada e estéril, frascos Schott (marca BOECO, 250 mL, Alemanha), frascos Spinner (marca WHEATON, 500 mL).

As vidrarias e demais utensílios envolvidos na realização do processo de cultivo celular foram esterilizados em autoclaves da marca FABBE LTDA, por 30 minutos a 121°C.

## **4.2 - MÉTODOS**

### **4.2.1 – ANÁLISES QUÍMICAS**

Os experimentos de cultivo foram acompanhados através da análise da concentração dos nutrientes (D-Glicose e aminoácidos) e metabólitos (lactato, amônia) ao longo dos cultivos realizados na temperatura de 37 °C, 5 % v/v CO<sub>2</sub> e pH inicial de aproximadamente 7,35.

Concentração de L-Glutamina e outros aminoácidos foram obtidas por HPLC marca Waters 717 plus Autosampler (detector UV – 254nm) usando uma coluna de fase reversa (Pico.Tag<sup>®</sup> column – 3.9 mm x 30 cm) depois da derivatização das amostras segundo metodologia Waters. A concentração de D-Glicose e lactato foram obtidas usando uma coluna (Aminex<sup>®</sup> HPX-87H column 300 x 7.8 mm) usando como eluente solução de ácido sulfúrico 5,0 mmol.L<sup>-1</sup>.

## 4.2.2 - CONTAGEM E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

O acompanhamento da concentração celular e da viabilidade celular durante o cultivo foram realizados através do método de exclusão de corante utilizando solução aquosa de 0,4 % azul de trypan (Trypan Blue, Sigma T-6146) (Freshney, 1994).

A concentração de células foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Para tal eram retiradas amostras do cultivo de 20  $\mu\text{L}$  que em seguida eram misturadas com 20  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa 0,4 % de Trypan Blue. Com ajuda de uma micropipeta colocava-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da amostra corada numa câmara de Neubauer previamente montada e fazia-se a contagem no microscópio ótico com magnificação de 20 vezes. As células não coradas eram classificadas como células viáveis, já as células coradas eram classificadas como células inviáveis.

A concentração celular era calculada como número de células totais de acordo com a equação 1. Já a viabilidade celular era calculada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células totais no meio de acordo com a equação 2.

$$N_t \times D \times 10^4 = X_T \text{ (Células Totais} \times \text{mL}^{-1}\text{)} \quad \text{Equação 1}$$

$$\frac{n_v}{N_t} \times 100 = Y \% \text{ (Células Viáveis)} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$N_t$  = número de células totais

$n_v$  = número de células viáveis

$X_T$  é o número de células totais por mL

$Y$  é o valor em porcentagem da viabilidade celular

$D$  = fator de diluição para hibridomas:  $D = 2$

O volume do quadrante no hamacitômetro utilizado para a contagem de células (vide Figura 4.1) era de  $10^{-4}$  mL.

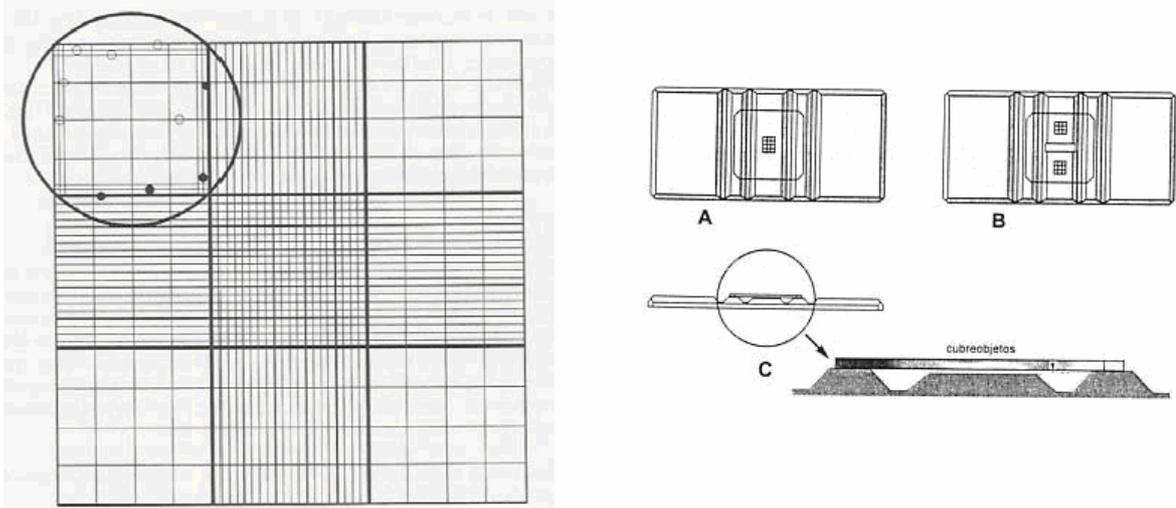


Figura 4.1 – Representação de câmara de Neubauer utilizada nas contagens de células de hibridomas.

#### 4.2.3 - VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO CELULAR

A partir dos resultados obtidos nos cultivos dos hibridomas em estudo, que estão representados em gráficos de concentração celular em função do tempo para melhor compreensão dos dados, foi possível determinar a velocidade específica máxima de crescimento celular,  $\mu_{\text{máx}}$ , considerando-se a seguinte equação abaixo:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento celular,  $X$  é a concentração de células viáveis (em células  $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $t$  (em horas) é tempo de cultivo. Na região onde o crescimento celular ocorre de forma exponencial temos:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \text{cte} = \mu_{\text{máx}} \quad (\text{Equação 4})$$

Integrando a equação 4 obtemos a equação 5:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\acute{a}x} \times (t - t_0) \quad (\text{Equa\c{c}\~{a}o 5})$$

Onde, o \(\ln X\_0\) \(\acute{e}\) o n\(\acute{u}\)mero de c\(\acute{e}\)lulas vi\(\acute{a}\)veis no in\(\acute{i}\)cio da fase exponencial de crescimento celular e o valor de \(\mu\_{m\acute{a}x}\) \(\acute{e}\) o coeficiente angular do gr\(\acute{a}\)fico \(\ln X\) versus \(t\).

#### 4.2.4 - TEMPO DE GERA\c{C}\~{A}O, \(T\_G\)

A determina\c{c}\~{a}o do tempo de gera\c{c}\~{a}o, \(T\_G\) (em horas), foi obtida considerando-se a seguinte equa\c{c}\~{a}o:

$$T_G = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Equa\c{c}\~{a}o 6})$$

#### 4.2.5 – PROCEDIMENTO DE CONGELAMENTO E ESTOCAGEM DOS TR\(\acute{E}\)S HIBRIDOMAS

Durante o trabalho as etapas de congelamento e estocagem das tr\(\acute{e}\)s linhagens de hibridomas murinos eram realizadas seguindo as etapas descritas a seguir:

1 - As linhagens celulares utilizadas durante os experimentos eram descongeladas e cultivadas em 5 mL de meio RPMI 1640 a 20 % v/v de SFB em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> sendo a concentra\c{c}\~{a}o inicial celular igual a 2,0 x 10<sup>5</sup> c\(\acute{e}\)lulas.mL<sup>-1</sup>. O meio de cultura RPMI 1640 utilizado para o cultivo era devidamente acondicionado em geladeira sob temperatura de 4 °C no intuito de evitar degrada\c{c}\~{a}o dos reagentes. Para ser reutilizado, era previamente aquecido \(\grave{a}\) temperatura de 37°C;

2 - As c\(\acute{e}\)lulas no frasco de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> eram acondicionadas em incubadora \(\grave{a}\) temperatura de 37°C e concentra\c{c}\~{a}o de 5 % v/v do g\(\acute{a}\)s CO<sub>2</sub>. Ap\(\acute{o}\)s atingirem viabilidade celular acima de 95% a cultura era centrifugada a 800 rpm durante 5 minutos e o pellet formado ressuspendido com meio fresco em frasco de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> com o

intuito de ampliar a cultura, mantendo  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> a concentração celular do inóculo;

3 - Estando a cultura em fase de crescimento exponencial as células eram centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, o “pellet” formado era ressuspensionado com solução de SFB (90 % v/v) e Dimetil Sulfoxido (DMSO, 10 % v/v) que era previamente preparada sob condições de assepsia e resfriada a temperatura de aproximadamente 37 °C no intuito de evitar danos às células devido a choque térmico;

4 - Amostras de 1,0 mL contendo  $1,0 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> eram transferidas para criotubos e acondicionadas em recipiente adequado, imersas em álcool isopropílico, e a seguir, levadas a temperatura de aproximadamente -80 °C durante 24 horas;

5 - Após acondicionamento a -80 °C durante 24 horas, os criotubos eram levados a armazenamento em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196 °C.

#### **4.2.6 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO NO CULTIVO DOS TRÊS HIBRIDOMAS**

Durante as Etapas 1 e 2 do trabalho os experimentos foram realizados os seguintes procedimentos para cultivo dos hibridomas, cujo esquema está representado na Figura 4.2.

As células em estudo eram mantidas estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C) onde havia preservação deste material por períodos que podiam chegar a alguns meses.

Para serem utilizados em cultura eram ativados em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> utilizando nesta etapa sempre meio de cultura contendo 20 % v/v SFB. Ao recuperar sua viabilidade (90 - 95 %) as células eram inoculadas em 5 mL de meio RPMI 1640 em frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. O meio de cultura RPMI 1640 utilizado para o cultivo era devidamente acondicionado em geladeira sob

temperatura de 4 °C no intuito de evitar degradação dos reagentes. Para ser reutilizado, era previamente aquecido à temperatura de 37°C.

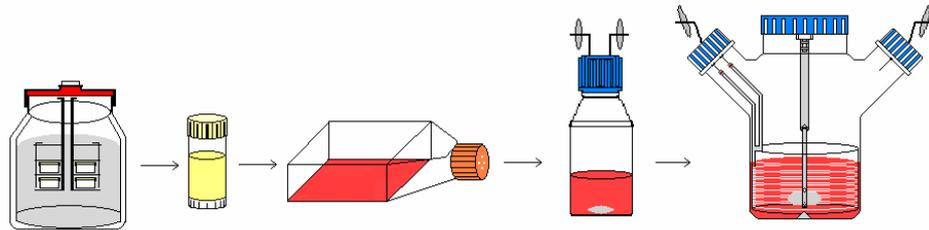


Figura 4.2 – Representação esquemática do procedimento do cultivo dos hibridomas. Iniciava-se com o descongelamento do criotubo proveniente do nitrogênio líquido, seguido de cultivo estático em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> até atingir concentração celular desejada. A seguir, fazia-se cultivo em frasco Schott sob agitação com barra magnética no intuito de adaptar as células ao estresse mecânico do cultivo dinâmico. Finalmente, fazia-se o cultivo em frasco Spinner devidamente aerado com uso de sistema de membrana de silicone.

As células no frasco de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> eram acondicionadas em incubadora à temperatura de 37°C e concentração de 5 % v/v do gás CO<sub>2</sub>. Após aproximadamente 24 horas de cultivo as células atingiam uma concentração suficiente com viabilidade acima de 95 % para inocular um frasco de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> com concentração inicial de inóculo de  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Então a cultura era centrifugada e o pellet formado ressuspensionado em frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> mantendo  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> a concentração celular do inóculo. À medida que a concentração celular aumentava e a viabilidade celular se mantinha em valores acima de 95 % as células passavam a ser cultivadas em frasco Schott de 250 mL, com um volume de trabalho de 55 mL, sendo a concentração inicial do inóculo sempre mantida em  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. As células eram cultivadas em frascos Schott sob progressivo aumento de agitação do meio mediante o uso de barra magnética no intuito de adaptar a cultura celular a condições de alto cisalhamento provocado pela agitação, visto que em frasco de cultura celular o cultivo acontecia de forma estática.

Estando a viabilidade celular superior a 90 % e o número de células sendo suficiente para preparo do inóculo para frasco Spinner, as células eram centrifugadas e ressuspendidas em meio de cultura e, em seguida, eram transferidas assepticamente para frasco Spinner de 500 mL contendo 200 mL de meio RPMI 1640 onde a concentração inicial celular deveria ser de  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>.

O frasco Spinner contendo meio inoculado era acondicionado em incubadora à temperatura de 37°C numa concentração de 5 % v/v do gás CO<sub>2</sub>, pH em 7,35 e rotação que variava de acordo com o hibridoma em estudo. Eram retiradas assepticamente amostras em intervalos de aproximadamente 8-12 horas com uso de micropipetas para realizar determinação da concentração dos nutrientes (glutamina, glicose e aminoácidos), metabólitos (lactato e amônia), além da concentração celular para determinação da taxa de crescimento e a respectiva viabilidade celular.

A concentração do íon amônio ao longo dos cultivos era obtida através do uso de eletrodo de íon seletivo amônio (Orion, modelo 93-18).

Para as três linhagens de hibridomas (anti-A, anti-B e anti-AB) era realizado um primeiro experimento em modo de operação em batelada onde eram obtidos os parâmetros cinéticos e o comportamento dos nutrientes, metabólitos e produtos durante o cultivo celular. Após a realização do primeiro experimento e a análise dos dados obtidos, um segundo experimento em modo de operação em batelada para cada linhagem era realizado, porém, nesta ocasião com modificação da concentração de alguns componentes do meio de cultura.

#### **4.2.7 – PLANEJAMENTO DO TRABALHO**

A programação dos experimentos para atingir os objetivos estabelecidos para a presente pesquisa ficou da seguinte forma:

**Tabela 4.2 – Programação geral dos experimentos de cultivo que foram realizados com os três hibridomas.**

<b>Etapa</b>	<b>Atividade</b>	<b>Finalidade</b>
1	Experimentos em frasco Spinner 500 mL com volume de trabalho de 200 mL a temperatura de 37 °C em concentração de 20% v/v SFB	Identificar fatores limitantes do crescimento celular e estimar parâmetros cinéticos de crescimento de cada hibridoma.
2	Experimentos em frasco Spinner 500 mL com volume de trabalho de 200 mL a temperatura de 37 °C em concentração de 10% v/v SFB	Identificar fatores limitantes de crescimento celular e estimar parâmetros cinéticos de crescimento de cada hibridoma.

Os experimentos de cultivo na presença de 20 % v/v de SFB forneceriam dados sobre o metabolismo e crescimento dos hibridomas em condições bastante favoráveis de cultivo. Já os experimentos a 10 % v/v de SFB forneceriam informações sobre o metabolismo e crescimento em condições de cultivo mais próximas das que seriam utilizadas num processo de produção de anticorpos monoclonais em larga escala, onde a presença de SFB é desestimulada pelos órgãos reguladores. Os experimentos nas duas concentrações de SFB também permitiriam conhecer a adequabilidade do meio de cultura para cada um dos hibridomas possibilitando a identificação de componentes chaves que estariam limitando o crescimento ou a produção de cada um dos anticorpos monoclonais.

## **5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os experimentos foram organizados para as três diferentes linhagens celulares em estudo em duas diferentes etapas seguindo a ordem cronológica em que foram realizados objetivando assim uma melhor compreensão dos resultados obtidos.

## 5.1 - ETAPA 1

Na primeira etapa do trabalho foi realizado um primeiro experimento em modo de operação em batelada com cada uma das três linhagens celulares em estudo onde foram levantados parâmetros cinéticos e dados da evolução dos nutrientes, metabólitos e produtos durante o cultivo celular.

### 5.1.1 - EXPERIMENTO I-ED-20%

Foi realizado um cultivo do hibridoma ED7-183A12 -  $\alpha$ A em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 20 % v/v de SFB (Cultilab), aproximadamente 25 mM D-Glicose, 4,05 mM L-Glutamina em incubadora de CO<sub>2</sub>, 5 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados representados nas Figuras 5.1, 5.2, e 5.3 apresentam a evolução do crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos durante o cultivo do Experimento I-ED-20%. O cultivo foi aerado após 27 horas com sistema de membrana de silicone na qual as vazões que passaram através da membrana variaram de 0,5 L.mL<sup>-1</sup> a 1,15 L.mL<sup>-1</sup>. A agitação foi mantida em 75 rpm durante o cultivo e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS).

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial apresentado pela linhagem celular ED7-183A12 em frasco Spinner no Experimento I-ED-20% foi de  $\mu_{\text{máx}} = 0,0498 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 13,92 horas.

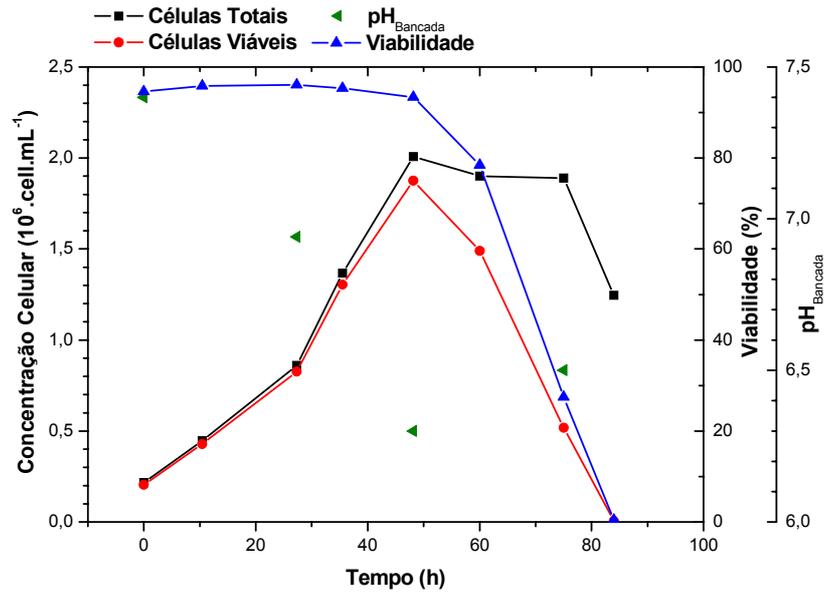


Figura 5.1 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.

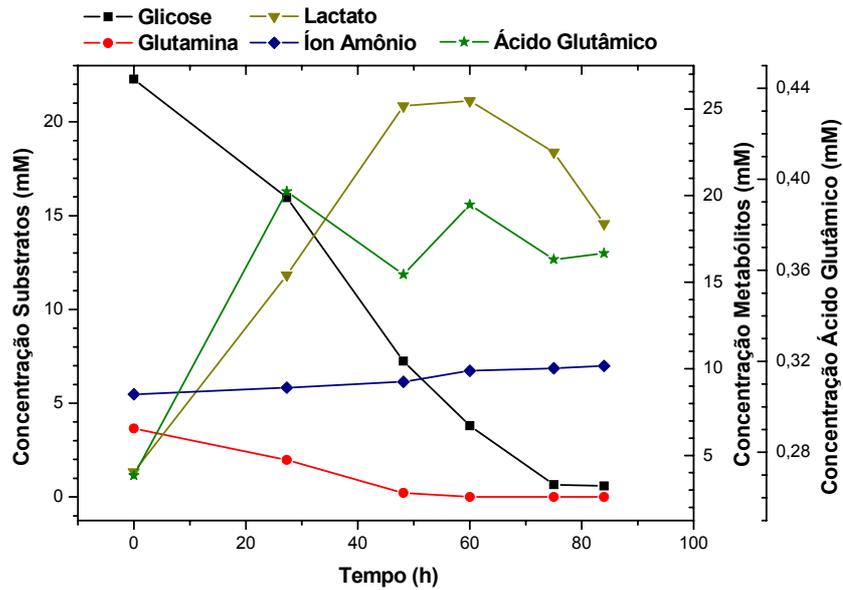


Figura 5.2 – Evolução do consumo de substratos e geração de metabólitos lactato e ácido glutâmico no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.

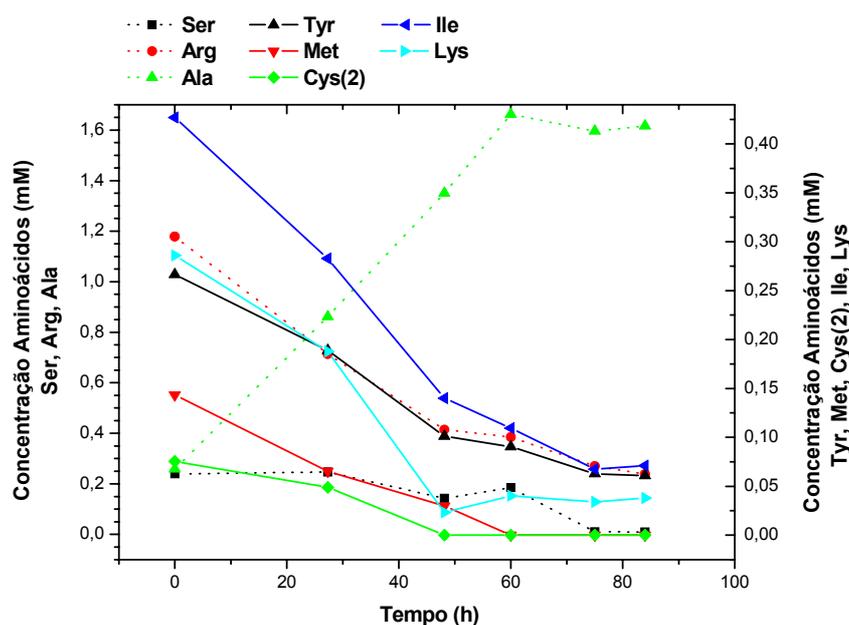


Figura 5.3 – Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o cultivo celular no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12.

**Tabela 5.1 – Consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento I-ED-20%**

Aminoácido	Consumo /Geração (%)
Asp	8,1
Glu	-36,2
Ser	96,0
Gln	100,0
His	40,8
Arg	79,8
Thr	70,5
Ala	-525,2
Pro	-13,0
Tyr	77,0
Val	73,2
Met	100,0
Cys(2)	100,0
Ile	83,4
Leu	9,7
Phe	68,2
Lys	86,7

Nota: A porcentagem de geração e ou consumo dos aminoácidos foi obtida utilizando-se do ponto inicial e final não levando em conta a oscilação nas concentrações dos mesmos ao longo do cultivo. Os valores positivos denotam o consumo de aminoácidos e os valores negativos indicam a geração de aminoácidos durante o cultivo.

A análise da Figura 5.1 evidencia uma diminuição da concentração de células viáveis e queda da viabilidade celular após aproximadamente 48 horas do cultivo o que pode ser explicado pelo total consumo do aminoácido glutamina do meio de cultura além da alta concentração de lactato (25 mM) e baixo valor de pH do meio de cultivo provavelmente devido ao metabolismo diferenciado em relação ao consumo de glicose das células mielomatosas e também devido a uma possível baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A análise da Figura 5.2 permite verificar que a concentração de glicose após término do Experimento I-ED-20% variou de 22,3 mM inicial a 0,6 mM no final do cultivo, o que sugere que, em estudos posteriores, a concentração inicial deste substrato pode ser adicionado em maiores concentrações no intuito de evitar limitação de crescimento celular devido exaustão deste açúcar, porém se reveste de grande interesse o estudo preliminar do comportamento metabólico da linhagem em questão frente a diferentes concentrações de substratos.

Os resultados apresentados sugerem que para os próximos experimentos a serem realizados os aminoácidos que apresentaram baixa concentração de acordo com os dados da Tabela 5.1 sejam adicionados ao meio de cultura para assegurar melhor crescimento celular conforme sugere Jo *et al.* (1993). Também deverá ser realizada adaptação dos hibridomas para crescimento em 10 % v/v de SFB e assim os experimentos seguintes serão comparados com o experimento I-ED-20% já realizado a 20 % v/v de SFB em termos de crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos além da produtividade e qualidade da imunoglobulina de interesse.

### 5.1.2 - EXPERIMENTO II-NAKA-20%

Um cultivo seguindo as mesmas iniciativas do Experimento I-ED-20% foi realizado com o hibridoma NAKA4-56A137 -  $\alpha$ B em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 20 % v/v de SFB (Cultilab), aproximadamente 25 mM D-Glicose, 4,05 mM L-Glutamina em incubadora com 5 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados representados na Figura 5.4, apresenta a evolução do crescimento celular.

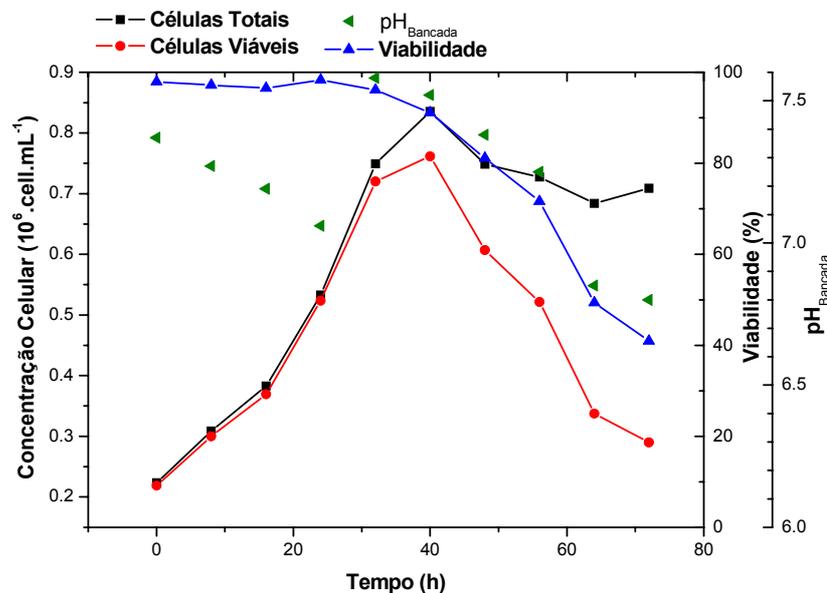


Figura 5.4 - Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o Experimento II-NAKA-20%-a no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.

O cultivo foi aerado após 24 horas com sistema de membrana de silicone na qual as vazões que passaram através da membrana variaram de 0,5 L.min<sup>-1</sup> a 1,0 L.min<sup>-1</sup>. A agitação foi mantida em 40 rpm durante o cultivo e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,5 M (solvente PBS).

Após a análise dos resultados do crescimento constatou-se que o número de células ficou abaixo do esperado ( $1,5-2,0 \times 10^6$ ), desta forma as análises para identificação de

substratos e metabólitos não foram realizadas visto que demandariam tempo e gasto de reagentes. Como o pH do meio de cultivo durante a realização do experimento é controlado por solução de NaOH 0,5 M (solvente PBS) acredita-se que volume inadequado de NaOH foi adicionado ao meio de cultivo o que pode ser evidenciado pela mudança no comportamento de crescimento a partir de 32 horas de cultivo. O pH do meio pode ter prejudicado o crescimento celular.

Um novo cultivo foi realizado com o hibridoma NAKA4-56A137 em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 20 % v/v de SFB (Cultilab), aproximadamente 25 mM D-Glicose, 4,05 mM L-Glutamina em incubadora com 5 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados representados nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 apresentam a evolução do crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos durante o cultivo do Experimento II-NAKA-20%-b. O cultivo foi aerado após 24 horas com sistema de membrana de silicone na qual as vazões que passaram através da membrana variaram de 0,5 L.min<sup>-1</sup> a 1,5 L.min<sup>-1</sup>. A agitação foi mantida em 40 rpm durante o cultivo e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,5 M (solvente PBS).

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial apresentado pela linhagem celular NAKA4-56A137 em frasco Spinner no Experimento II-NAKA-20%-b foi de  $\mu_{\text{máx}} = 0,0445 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 15,57 horas.

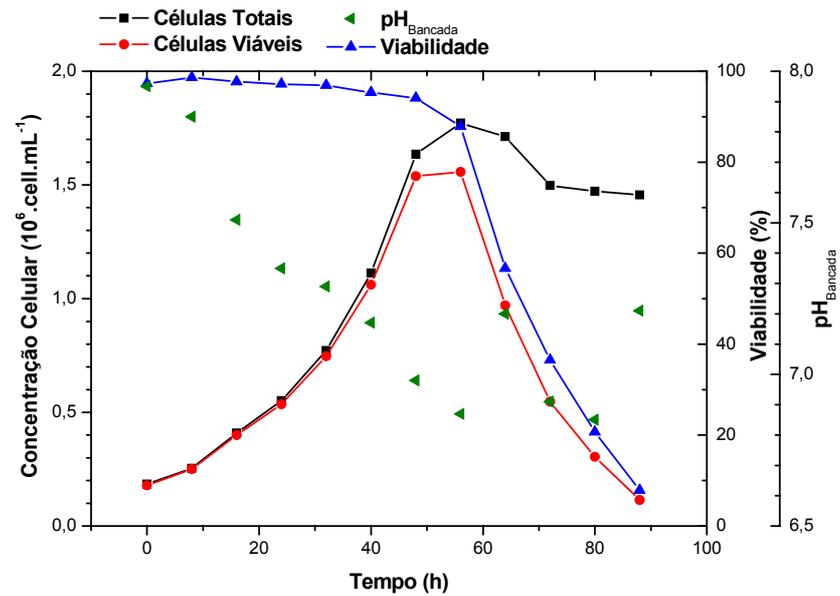


Figura 5.5 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o Experimento II-NAKA-20%-b no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.

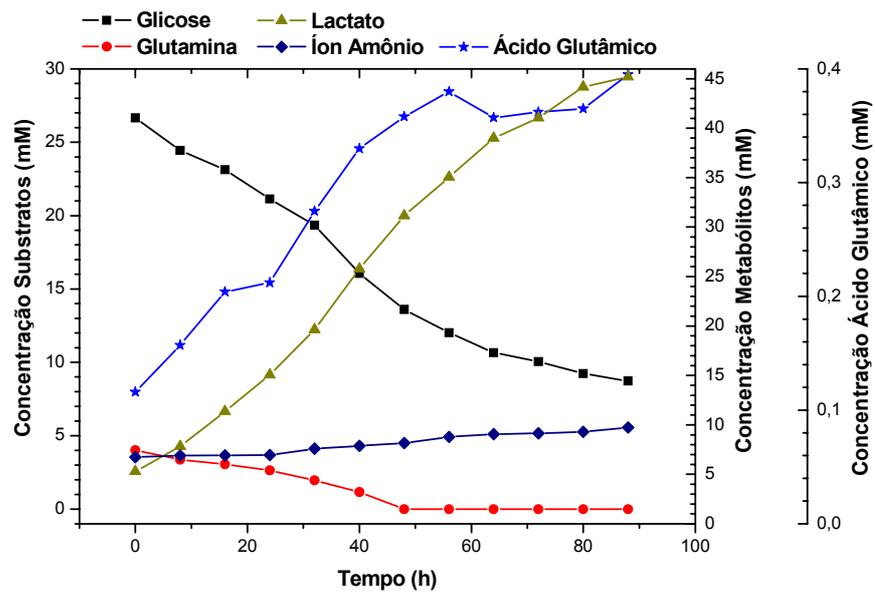


Figura 5.6 - Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato e ácido glutâmico durante o Experimento II-NAKA-20%-b no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.

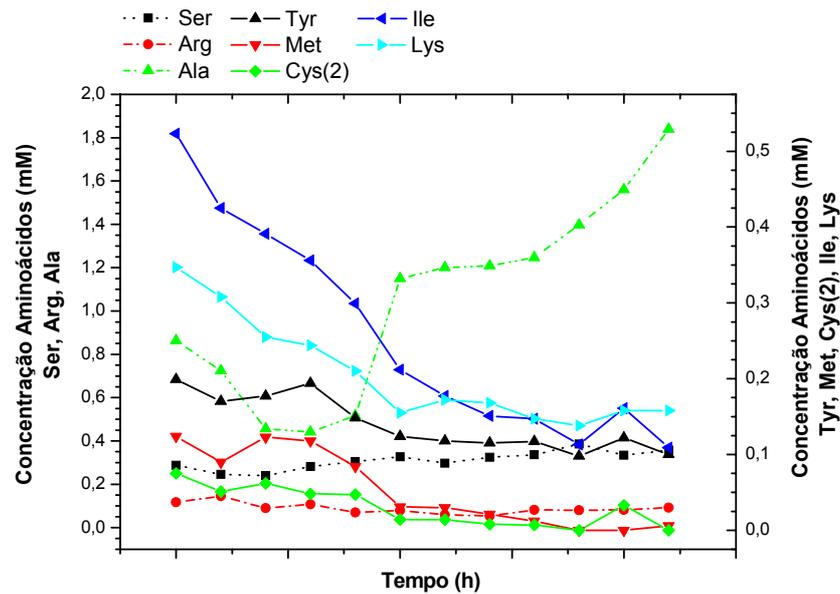


Figura 5.7 – Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento II-NAKA-20%-b no cultivo celular do hibridoma NAKA4-56A137.

Tabela 5.2 – Consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento II-NAKA-20%

Aminoácido	Consumo / Geração (%)
Asp	-1,72
Glu	-240,52
Ser	-24,31
Gln	100
Gly	-69,00
His	100
Arg	21,37
Thr	-228,57
Ala	-113,21
Pro	-49,48
Tyr	49,75
Val	68,03
Met	95,16
Cys(2)	100
Ile	79,16
Leu	83,16
Phe	69,78
Lys	54,47

Nota: A porcentagem de geração e ou consumo dos aminoácidos foi obtida utilizando-se do ponto inicial e final não levando em conta a oscilação nas concentrações dos mesmos ao longo do cultivo. Os valores positivos denotam o consumo de aminoácidos e os valores negativos indicam a geração de aminoácidos durante o cultivo.

A análise da Figura 5.5 evidencia uma diminuição da concentração de células viáveis e queda da viabilidade celular após aproximadamente 52 horas do cultivo, o que pode ser explicado pelo total consumo do aminoácido glutamina do meio de cultura além da alta concentração de lactato (35 mM) e baixo valor de pH provavelmente devido ao metabolismo diferenciado em relação ao consumo de glicose das células mielomatosas. Também pode ter influenciado a baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A análise da Figura 5.6 permite verificar que a concentração de glicose após término do Experimento II-NAKA-20%-b variou de 26,7 mM inicial a 8,7 mM no final do cultivo, o que sugere que, em estudos posteriores, a concentração inicial deste substrato pode ser adicionado em menores concentrações no intuito de assegurar menor produção de lactato, porém se reveste de grande interesse o estudo preliminar do comportamento metabólico da linhagem em questão frente a diferentes concentrações de substratos.

Os resultados apresentados sugerem que para os próximos experimentos a serem realizados os aminoácidos que apresentaram baixa concentração de acordo com os dados da Tabela 5.2 sejam adicionados ao meio de cultura para assegurar melhor crescimento celular conforme sugere JO *et al.* (1993). Também poderá ser realizada adaptação dos hibridomas em estudo para crescimento em 10 % v/v de SFB e assim os experimentos seguintes serão comparados com o experimento II-NAKA-20%-b já realizado a 20 % v/v de SFB em termos de crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos além da produtividade e qualidade da imunoglobulina de interesse.

### **5.1.3 – EXPERIEMENTO III-TAN-20%**

Durante o preparo de inóculo para realização do experimento com a linhagem TAN1-112A18 -  $\alpha$ AB surgiram problemas de crescimento da linhagem. Ao realizar o descongelamento da linhagem seguindo os mesmos procedimentos com as linhagens

anteriores a cultura apresentava-se totalmente morta após 24 horas. Na tentativa de solucionar o problema esta linhagem foi ativada nas instalações do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP).

Um cultivo seguindo as mesmas iniciativas do Experimento I-ED-20% foi realizado com o hibridoma murino TAN1-112A18 -  $\alpha$ AB em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 20 % v/v de SFB (Cultilab), aproximadamente 25 mM D-Glicose, 4,05 mM L-Glutamina em incubadora com 5 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, em que a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados representados nas Figuras 5.8, 5.9, 5.10, apresentam a evolução do crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos durante o cultivo do Experimento III-TAN-20%. O cultivo foi aerado após 24 horas com sistema de membrana de silicone na qual as vazões que passaram através da membrana variaram de 0,5 L.min<sup>-1</sup> a 1,3 L.min<sup>-1</sup>. A agitação foi mantida em 64 rpm durante o cultivo e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS).

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial apresentado pela linhagem celular TAN1-112A18 em frasco Spinner no Experimento III-TAN-20% foi de  $\mu_{\text{máx}} = 0,0320 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 21,69 horas.

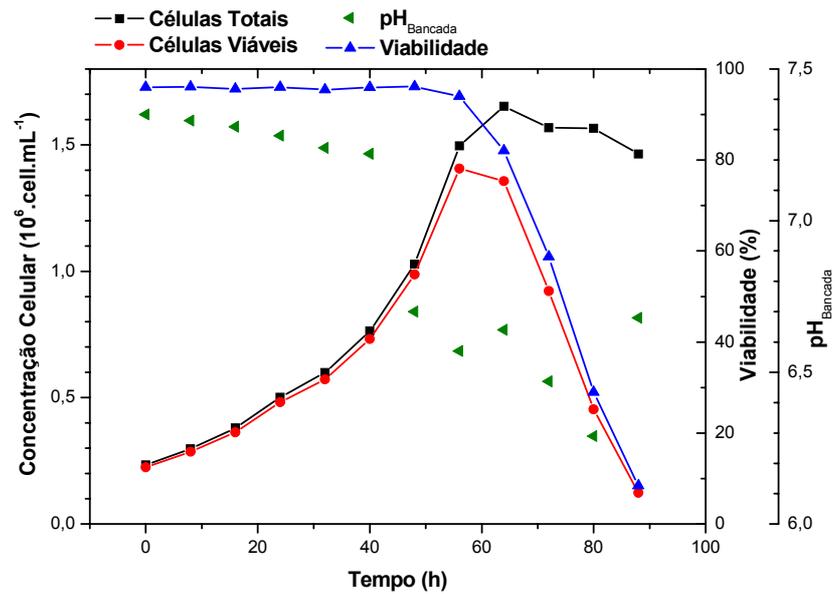


Figura 5.8 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o Experimento III-TAN-20% no cultivo do hibridoma TAN1-112A18.

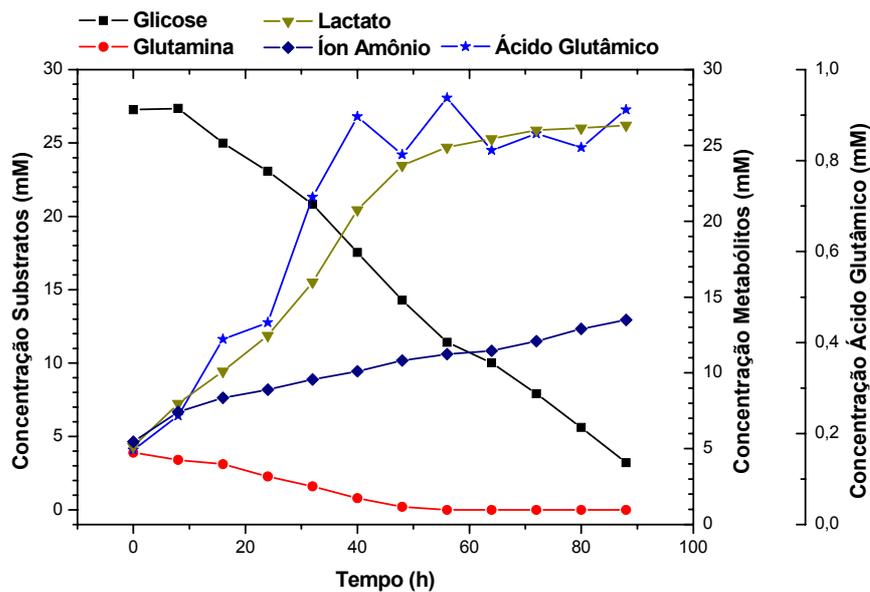


Figura 5.9 - Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento III-TAN-20% no cultivo do hibridoma TAN1-112A18.

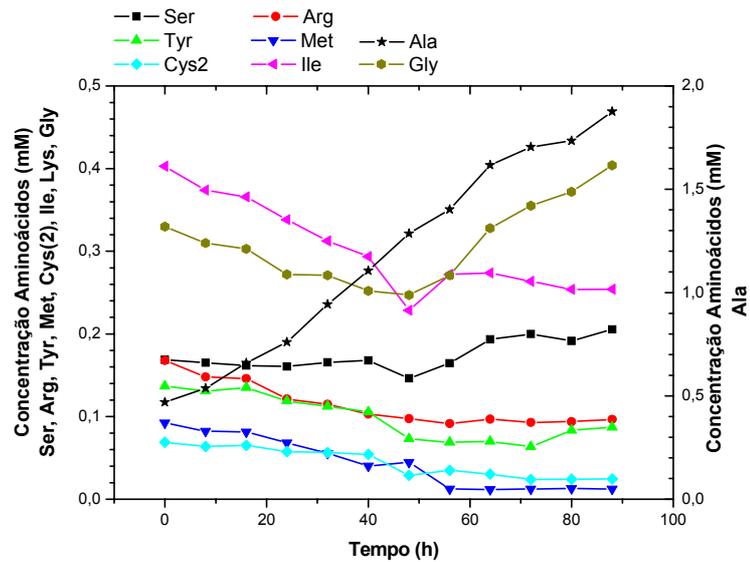


Figura 5.10 – Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento III-TAN-20% no cultivo celular do hibridoma TAN1-112A18.

Tabela 5.3 – Consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento III-TAN-20%

Aminoácido	Consumo / Geração (%)
Asp	-30,65
Glu	-455,58
Ser	-21,68
Gln	100
Gly	-22,42
His	12,97
Arg	42,52
Thr	63,80
Ala	-299,53
Pro	-18,04
Tyr	36,34
Val	44,53
Met	86,53
Cys(2)	64,65
Ile	36,92
Leu	40,59
Phe	38,65
Lys	49,36
Trp	20,45

Nota: A porcentagem de geração e ou consumo dos aminoácidos foi obtida utilizando-se do ponto inicial e final não levando em conta a oscilação nas concentrações dos mesmos ao longo do cultivo. Os valores positivos denotam o consumo de aminoácidos e os valores negativos indicam a geração de aminoácidos durante o cultivo.

A análise da Figura 5.8 evidencia uma diminuição da concentração de células viáveis e queda da viabilidade celular após aproximadamente 56 horas do cultivo que é acompanhado pela queda do valor de pH além da alta concentração de lactato (25mM) do meio de cultivo provavelmente devido ao metabolismo diferenciado em relação ao consumo de glicose das células mielomatosas e também devido a uma possível baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A análise da Figura 5.9 permite verificar que a concentração de glicose após término do Experimento III-TAN-20% variou de 27,3 mM inicial a 3,21 mM no final do cultivo, o que sugere que, em estudos posteriores, a concentração inicial deste substrato seja adicionado nas mesmas concentrações.

Os resultados apresentados sugerem que para os próximos experimentos a serem realizados os aminoácidos que apresentaram baixa concentração de acordo com dados da Tabela 5.3 sejam adicionados ao meio de cultura para assegurar melhor crescimento celular conforme sugere JO *et al.* (1993). Também será realizada adaptação dos hibridomas em estudo para crescimento em 10 % v/v de SFB e assim os experimentos seguintes serão comparados com o experimento III-TAN-20% já realizado a 20 % v/v de SFB em termos de crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos além da produtividade e qualidade da imunoglobulina de interesse.

Para as três linhagens em que foram realizadas análises de consumo e geração de substratos durante o cultivo celular a evolução das concentrações dos aminoácidos estudados pode ser classificada em três grupos como sugere Duval *et al.* (1991).

Grupo 1: aminoácidos que são produzidos durante o cultivo celular como, por exemplo, a alanina que foi produzida pelas três linhagens nos experimentos conduzidos a 20 % v/v SFB sendo a linhagem ED7-183A12 a que mais produziu este aminoácido. Já o ácido glutâmico foi produzido pelas três linhagens nos experimentos conduzidos a 20 % v/v SFB

sendo a linhagem TAN1-112A18 a que mais produziu este aminoácido o que pode ser observado através da comparação das Tabelas 5.1, 5.2, 5.3.

Grupo 2: aminoácidos que são consumidos, porém não são totalmente exauridos durante o cultivo celular como é o caso da arginina, tirosina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina e lisina para os experimentos realizados a 20 % v/v de SFB.

Grupo 3: aminoácidos que são rapidamente exauridos durante o cultivo celular. Para o Experimento I-ED-20% foi identificado que os aminoácidos glutamina, serina, metionina e cisteína foram rapidamente exauridos do meio de cultivo. Já o Experimento II-NAKA-20%-b apresentou total consumo dos aminoácidos glutamina, metionina, histidina e cisteína e no Experimento III-TAN-20% foram rapidamente exauridos do meio de cultivo os aminoácidos glutamina, metionina e cisteína.

#### **5.1.4 – COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CRESCIMENTO CELULAR A 20 % v/v SFB DAS TRÊS DIFERENTES LINHAGENS EM ESTUDO**

O comportamento de crescimento celular das três diferentes linhagens de hibridomas murinos em estudo está representado na Figura 5.11 onde podemos observar que as linhagens apresentaram características de crescimento diferenciado o que é comprovado pela diferença dos valores da velocidade específica máxima de crescimento celular calculada durante a fase de crescimento exponencial das três diferentes culturas em estudo que foi comparada na Tabela 5.4. Ambos os Experimentos I-ED-20%, II-NAKA-20%-b e III-TAN-20% foram suplementados com 20 % v/v SFB (Cultilab), aproximadamente 25 mM D-Glucose e 4,05 mM L-Glutamina.

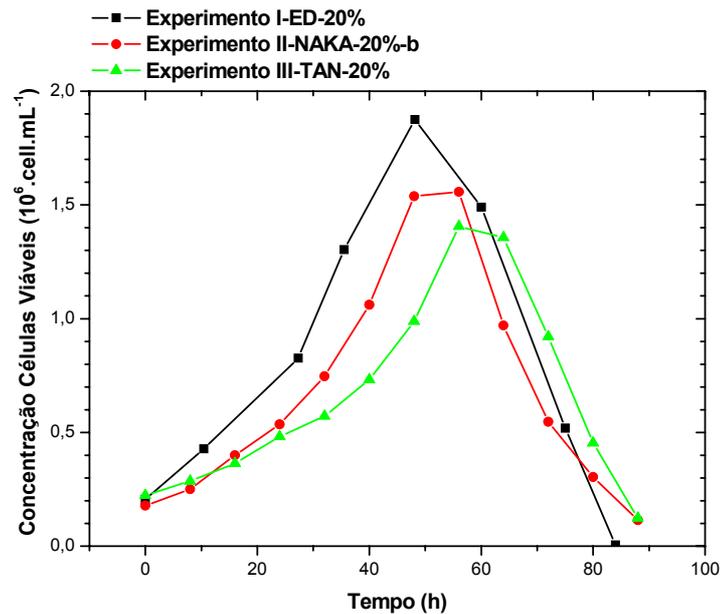


Figura 5.11 – Comparação do comportamento de crescimento em concentração de 20 % v/v de SFB das três linhagens de hibridomas murinos em estudos.

**Tabela 5.4 – Velocidade específica máxima de crescimento celular em concentrações de 20 % v/v de SFB das três diferentes linhagens de hibridomas murinos em estudo.**

Experimento	Linhagem	Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ )	Tempo de geração (h)	Densidade máxima celular ( $10^6 \cdot cell \cdot mL^{-1}$ )
I-ED-20%	ED7-183A12	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,0498$	13,92	$C_{Xm\acute{a}x} = 2,0$
II-NAKA-20%-b	NAKA4-56A137	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,0445$	15,57	$C_{Xm\acute{a}x} = 1,77$
III-TAN-20%	TAN1-112A18	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,0320$	21,69	$C_{Xm\acute{a}x} = 1,65$

## 5.2 - ETAPA 2

Na segunda etapa do trabalho foi realizado um segundo experimento em modo de operação em batelada com cada uma das três linhagens celulares em estudo onde foram levantados parâmetros cinéticos e dados da evolução dos nutrientes, metabólitos e produtos durante o cultivo celular utilizando meio de cultura com uma concentração de SFB a 10 % v/v (Gibco™) e adição dos aminoácidos que foram exauridos segundo os resultados obtidos na Etapa 1 deste trabalho.

### 5.2.1 - EXPERIMENTO IV-ED-10%

Durante o procedimento de adaptação da cultura celular ao crescimento em concentração de 10 % v/v SFB a linhagem celular ED7-183A12 foi ativada em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> utilizando nesta etapa sempre meio de cultura contendo 20 % v/v SFB. Ao recuperar sua viabilidade para valores em torno de 90 - 95 % num período que demandou 8 dias, as células eram inoculadas em 5 mL de meio RPMI 1640 em frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Foi realizada a passagem da cultura a cada 24 horas e a diminuição gradativa da concentração de SFB a cada 48 horas (20,18,16,14,12,10 % v/v SFB) no intuito de condicionar a cultura celular a se propagar em 10 % v/v de SFB. A Figura 5.12 apresenta a evolução da adaptação celular a concentrações decrescentes de SFB.

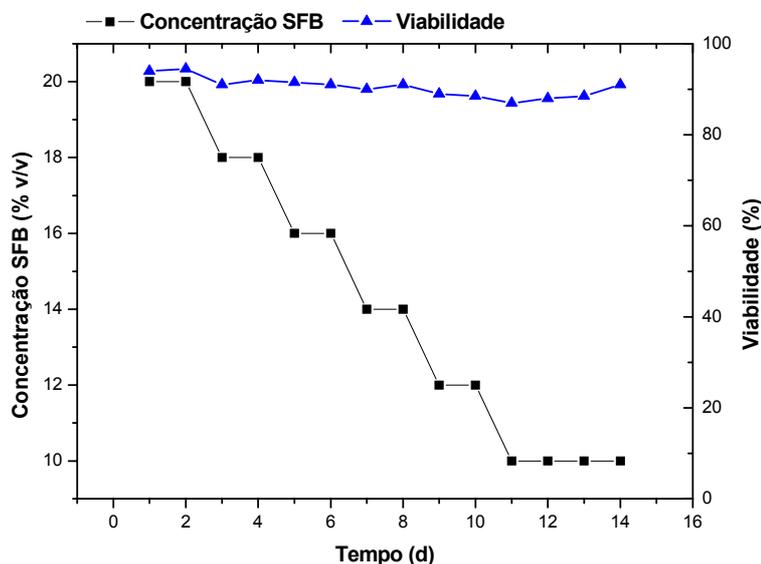


Figura 5.12 – Evolução da adaptação celular da linhagem ED7-183A12 em diferentes concentrações de SFB com intuito de conseguir uma adaptação estável a 10 % v/v de SFB.

De acordo com os resultados obtidos no Experimento I-ED-20% foi realizado um cultivo do hibridoma ED7-183A12 -  $\alpha$ A em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 10 % v/v de SFB (Gibco™), aproximadamente 28 mM D-Glicose, 6,0 mM L-

Glutamina em incubadora de CO<sub>2</sub>, 9,0 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados representados na Figura 5.13 apresentam a evolução do crescimento celular durante o cultivo. O cultivo foi aerado após 24 horas com sistema de membrana na qual as vazões que passaram através da membrana de silicone variaram de 1,0 L.mL<sup>-1</sup> a 1,5 L.mL<sup>-1</sup>.

Durante o cultivo representado na Figura 5.13 a agitação foi mantida em 110 rpm e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS). Acredita-se que o crescimento celular foi limitado devido a inadequado controle de pH do meio de cultivo e a falta de homogeneidade da agitação, pois a interação do agitador com sistema de membrana de aeração provocava movimentos bruscos no meio de cultura o que pode ser prejudicial à cultura.

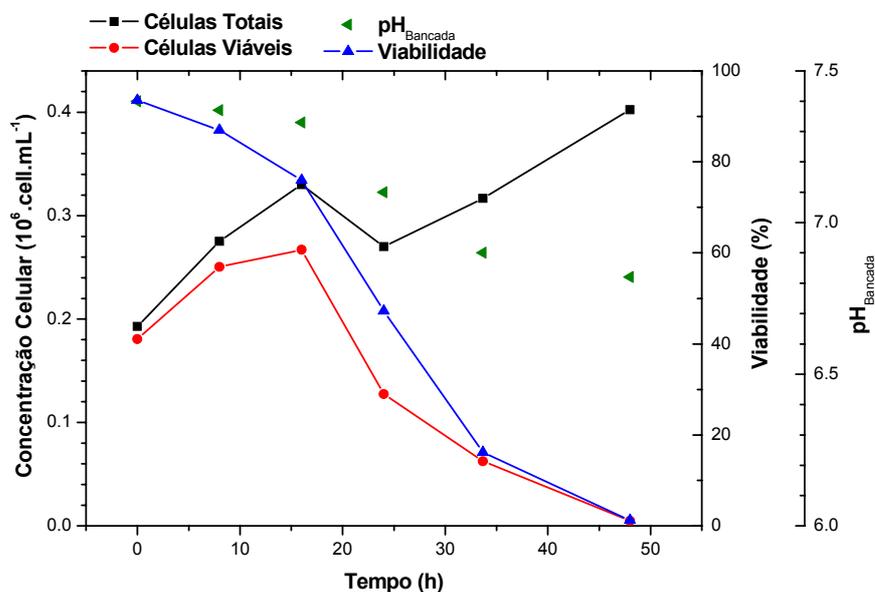


Figura 5.13 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-a realizado com o hibridoma ED7-183A12.

Já o cultivo representado na Figura 5.14 foi realizado na ausência do sistema de membrana, sendo a oxigenação feita pela passagem de ar esterilizado por filtração sobre a superfície do meio de cultura. Após 24 horas do início do experimento o pH do meio de

cultivo aumentou, o que ficou evidenciado pela mudança de coloração do meio devido à presença de indicador vermelho de fenol. Esse aumento deve ter sido provocado pela remoção do CO<sub>2</sub> provocada pela corrente de ar escoando sobre a superfície do meio de cultura. A agitação foi mantida em 75 rpm e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS) e acredita-se que o crescimento celular foi limitado devido a inadequado controle de pH, pois após retirada da passagem de ar e estabelecido novamente o controle do pH do meio observou-se a 56 horas do início do experimento retomada do crescimento celular.

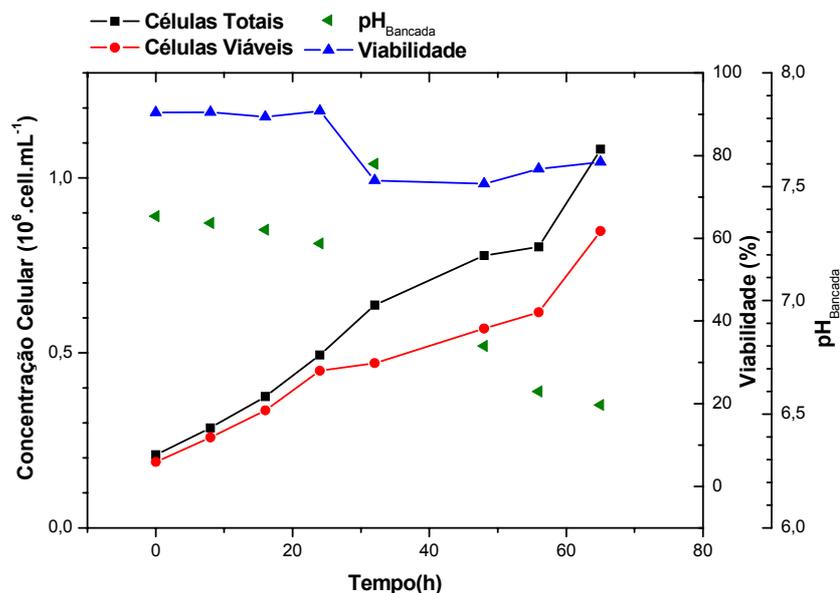


Figura 5.14 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-b realizado com o hibridoma ED7-183A12.

Um novo cultivo, de acordo com os resultados obtidos no Experimento I-ED-20%, foi realizado com o hibridoma ED7-183A12- $\alpha$ A em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 10 % v/v de SFB (Gibco™), aproximadamente 28 mM D-Glicose, 6,0 mM L-Glutamina em incubadora de CO<sub>2</sub>, 9,0 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados representados nas Figuras 5.15, 5.16, 5.17 apresentam a evolução do

crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos durante o cultivo do Experimento IV-ED-10%-c. O cultivo foi aerado após 24 horas com sistema de membrana de silicone na qual as vazões que passaram através da membrana variaram de 1,0 L.mL<sup>-1</sup> a 1,5 L.mL<sup>-1</sup>. A agitação foi mantida em 75 rpm durante o cultivo e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS).

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial apresentado pela linhagem celular ED7-183A12 em frasco Spinner no Experimento IV-ED-10%-c foi de  $\mu_{\text{máx}} = 0,0412 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 16,84 horas.

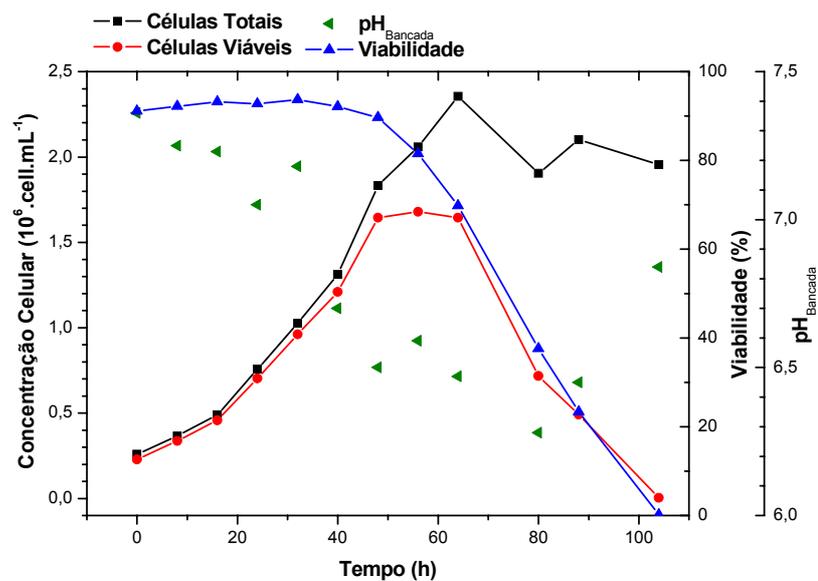


Figura 5.15 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o hibridoma ED7-183A12.

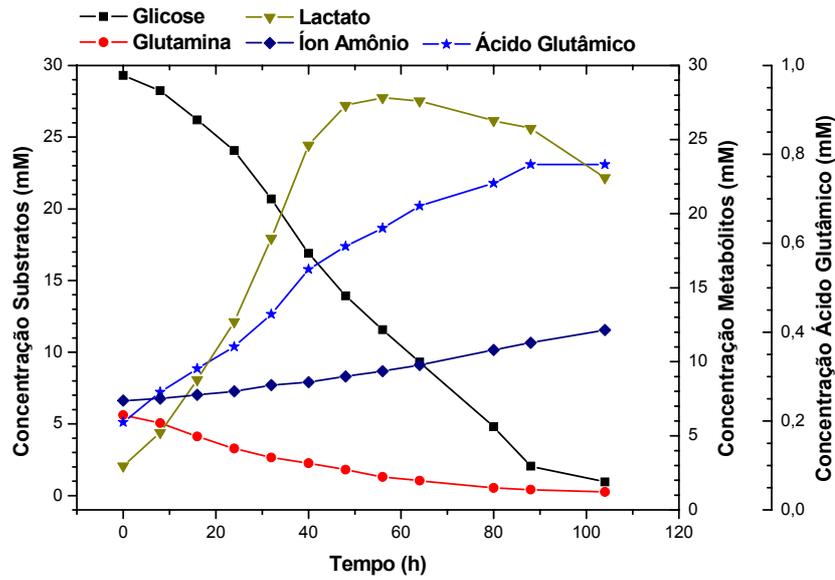


Figura 5.16 - Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento IV-ED-10%-c no cultivo do hibridoma ED7-183A12.

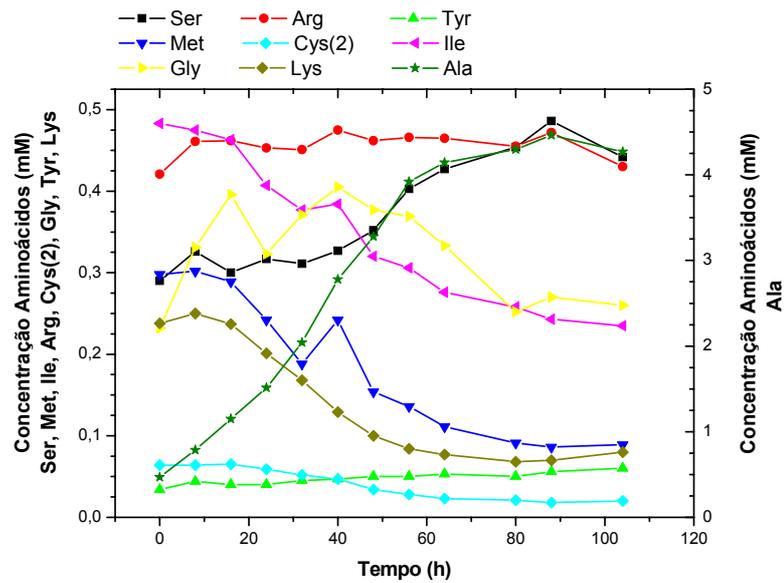


Figura 5.17 – Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento IV-ED-10%-c no cultivo celular do hibridoma ED7-183A12.

**Tabela 5.5 – Consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento IV-ED-10%-c**

Aminoácido	Consumo / Geração (%)
Asp	-1,08
Glu	-294,42
Ser	-52,41
Gln	87,0
Gly	-12,07
His	40,0
Arg	-2,14
Thr	-3,26
Ala	-810,66
Tyr	-76,47
Val	54,55
Met	70,13
Cys(2)	68,75
Ile	51,35
Leu	58,30
Phe	75,52
Lys	66,39
Trp	-21,07

Nota: A porcentagem de geração e ou consumo dos aminoácidos foi obtida utilizando-se do ponto inicial e final não levando em conta a oscilação nas concentrações dos mesmos ao longo do cultivo. Os valores positivos denotam o consumo de aminoácidos e os valores negativos indicam a geração de aminoácidos durante o cultivo.

Observa-se pela Figura 5.15 uma diminuição da concentração de células viáveis seguida da queda da viabilidade celular após aproximadamente 52 horas do cultivo o que pode ser explicado pela alta concentração de lactato (aproximadamente 28 mM) e baixo valor de pH do meio de cultivo provavelmente devido ao metabolismo diferenciado em relação ao consumo de glicose das células mielomatosas e também devido a uma possível baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A análise da Figura 5.16 permite verificar que a concentração de glicose após término do Experimento IV-ED-10%-c variou de 29,3 mM inicial a 1,0 mM no final do cultivo, o que sugere que, em estudos posteriores, a concentração inicial deste substrato possa ser adicionado em maiores concentrações no intuito de assegurar limitação de crescimento

celular devido à exaustão deste açúcar, porém se reveste de grande interesse o estudo preliminar do comportamento metabólico da linhagem em questão frente a diferentes concentrações de substratos.

Os resultados obtidos no Experimento I-ED-20% e Experimento IV-ED-10%-c foram plotados no gráfico da Figura 5.18 onde é possível comparar as características de crescimento celular da linhagem ED7-183A12 em diferentes concentrações de SFB.

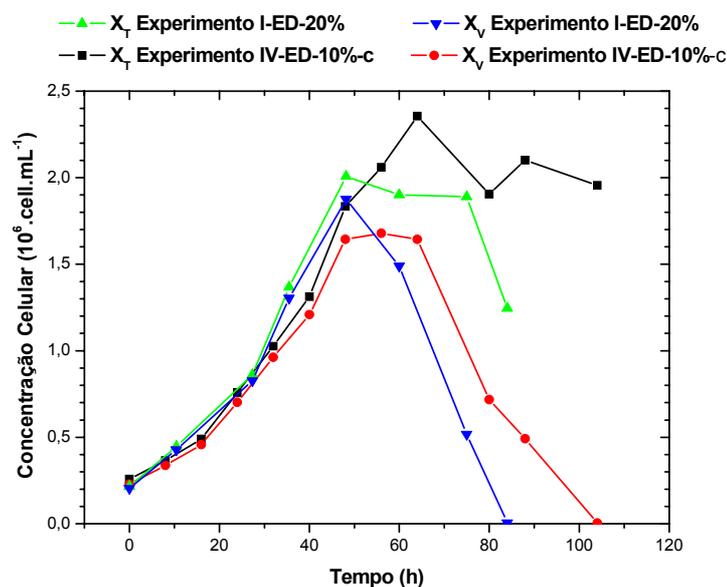


Figura 5.18 – Comparação do comportamento de crescimento do hibridoma ED7-183A12 em concentrações de 20 – 10 % v/v de SFB e aumento de 10 % na concentração dos componentes do meio de cultura.

A análise da Figura 5.18 permite concluir que o cultivo do hibridoma murino ED7-183A12 apresentou comportamento de crescimento diferenciado em diferentes concentrações de SFB e aminoácidos o que pode ser evidenciado pelos valores de velocidade específica de crescimento celular nos Experimentos I-ED-20% e IV-ED-10%-c apresentados na Tabela 5.6. A adição de nutrientes que foram exauridos do meio de cultivo resultou em aumento de 17 % do número total de células para a linhagem do hibridoma ED7-183A12 o que pode ser verificado pela análise da Figura 5.18, porém a densidade de células viáveis foi inferior, possivelmente devido à limitação de oxigenação no meio de cultura e diferente

comportamento metabólico apresentado pela linhagem na presença de maior concentração de D-Glicose e aminoácidos.

**Tabela 5.6 – Comparação da velocidade específica máxima de crescimento celular dos cultivos realizados com a linhagem de hibridoma murino ED7-183A12 em meios de cultura com diferentes concentrações de SFB e aminoácidos.**

Experimento	Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ )	Tempo de geração (h)
I-ED-20%	$\mu_{\text{máx}} = 0,0498$	13,92
I-ED-10%-c	$\mu_{\text{máx}} = 0,0412$	16,84

### 5.2.2 EXPERIMENTO V-NAKA-10%

Durante o procedimento de adaptação da cultura celular ao crescimento em concentração de 10 % v/v SFB a linhagem celular NAKA4-56A137 foi ativada em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> utilizando nesta etapa sempre meio de cultura contendo 20 % v/v SFB. Ao recuperar sua viabilidade para valores em torno de 90 - 95 % num período que demandou 5 dias, as células eram inoculadas em 5 mL de meio RPMI 1640 em frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Foi realizada a passagem da cultura a cada 24 horas e a diminuição gradativa da concentração de SFB a cada 48 horas (20,18,16,14,12,10 % v/v SFB) no intuito de condicionar a cultura celular a se propagar em 10 % v/v de SFB. A Figura 5.19 apresenta a evolução da adaptação celular a concentrações decrescentes de SFB.

De acordo com os resultados obtidos no Experimento II-NAKA-20% foi realizado um cultivo do hibridoma NAKA4-56A137 -  $\alpha$ B em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 10 % v/v de SFB (Gibco™), aproximadamente 28 mM D-Glicose, 6,0 mM L-Glutamina em incubadora de CO<sub>2</sub>, 9,0 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Neste experimento o inóculo foi preparado em frascos de cultura e transferido diretamente ao

frasco Spinner devido a inadequado crescimento celular desta cultura em frasco Schott, possivelmente devido à alta sensibilidade desta linhagem as condições cisalhantes do frasco Schott quando a cultura esta suplementada com apenas 10 % v/v de SFB. Os resultados representados nas Figuras 5.20, 5.21, 5.22 apresentam a evolução do crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos durante o cultivo do Experimento V-NAKA-10%-a. O cultivo foi aerado após 24 horas com sistema de membrana na qual as vazões que passaram através da membrana de silicone variaram de  $0,5 \text{ L.mL}^{-1}$  a  $1,5 \text{ L.mL}^{-1}$ .

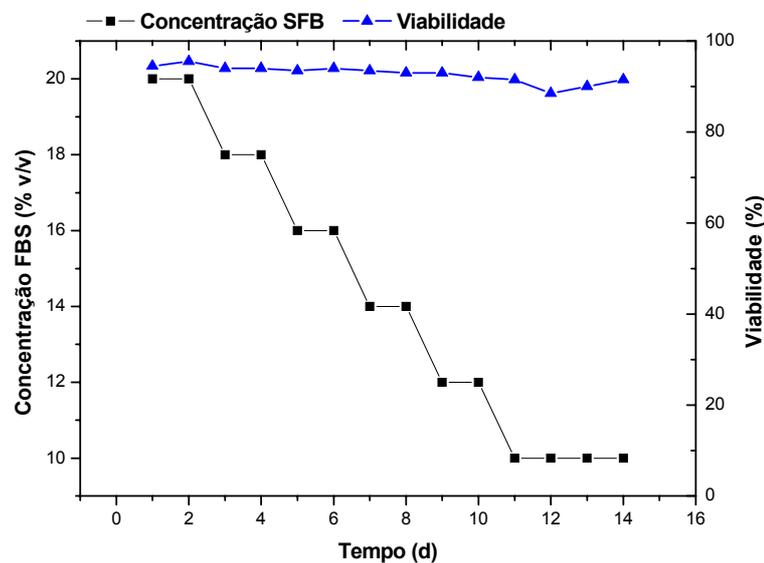


Figura 5.19 – Evolução da viabilidade celular da linhagem NAKA4-56A137 em diferentes concentrações de SFB com o intuito de conseguir uma adaptação estável a 10 % v/v de SFB.

Durante o cultivo representado na Figura 5.20 a agitação foi mantida em 64 rpm e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS). Acredita-se que o crescimento celular foi limitado devido a inadequado controle de pH e a falta de homogeneidade da agitação, pois a interação do agitador com o sistema de membrana provocava movimentos bruscos no meio de cultivo que podem ter sido prejudiciais à cultura. Existe vasta informação na literatura especializada mostrando o efeito protetor do SFB da ação das forças hidrodinâmicas do fluido (Chuck, *et al.*, 1991; Sanfeliu, *et al.*, 1996).

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial apresentado pela linhagem celular NAKA4-56A137 em frasco Spinner no Experimento V-NAKA-10%-a foi de  $\mu_{\text{máx}} = 0,0284 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 24,40 horas.

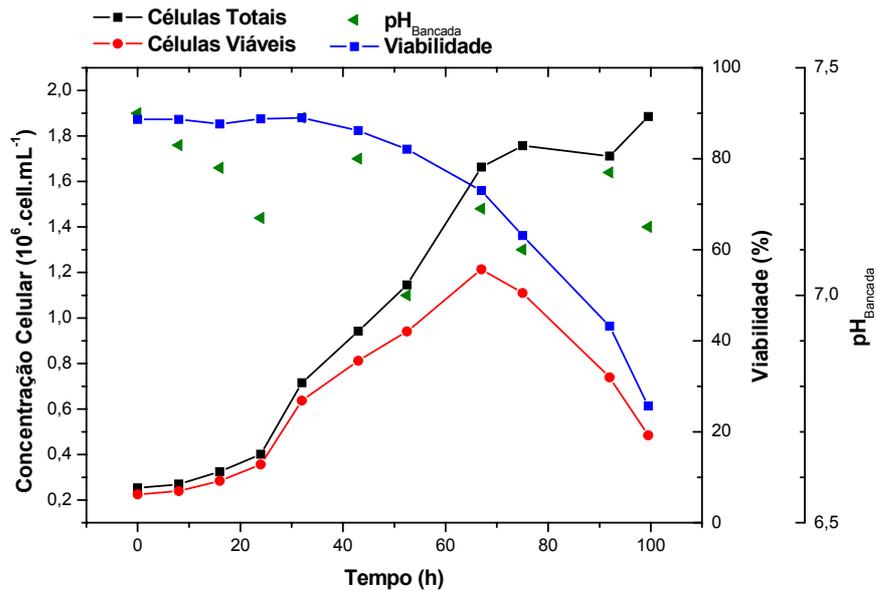


Figura 5.20 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.

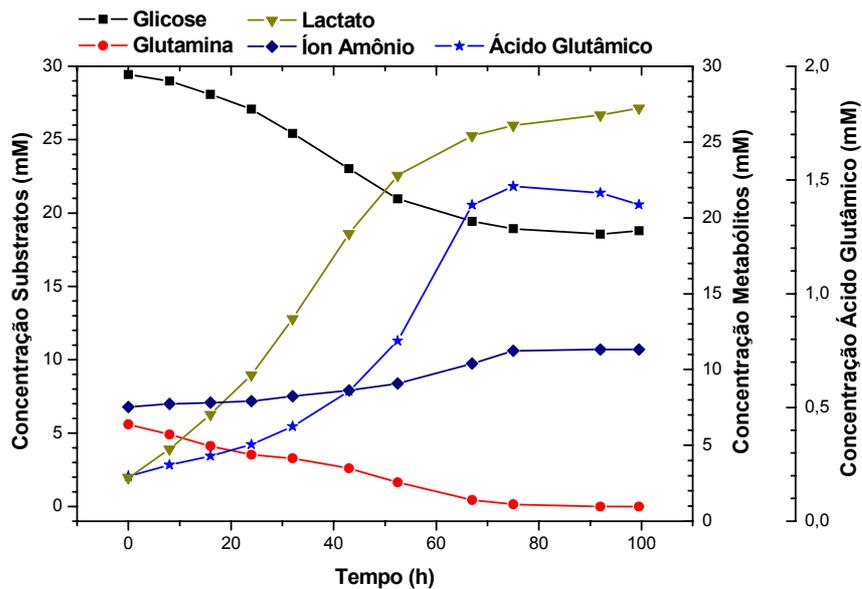


Figura 5.21 - Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento V-NAKA-10%-a no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.

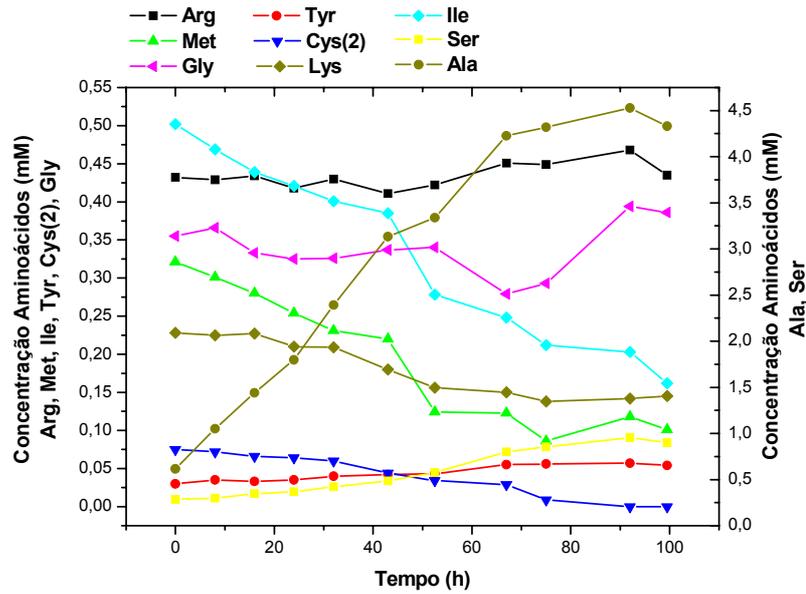


Figura 5.22 – Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-a no cultivo celular do hibridoma NAKA4-56A137.

Tabela 5.7 – Consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-a

Aminoácido	Consumo / Geração (%)
Asp	10,42
Glu	-602,53
Ser	-215,19
Gln	100
Gly	-8,73
His	-36,67
Arg	-0,7
Thr	14,81
Ala	-604,07
Tyr	-80,0
Val	49,04
Met	68,54
Cys(2)	100
Ile	67,73
Leu	74,39
Phe	48,98
Lys	36,40
Trp	7,76

Nota: A porcentagem de geração e ou consumo dos aminoácidos foi obtida utilizando-se do ponto inicial e final não levando em conta a oscilação nas concentrações dos mesmos ao longo do cultivo. Os valores positivos denotam o consumo de aminoácidos e os valores negativos indicam a geração de aminoácidos durante o cultivo.

Observa-se pela Figura 5.20 uma diminuição da concentração de células viáveis seguida da queda da viabilidade celular após aproximadamente 43 horas do cultivo o que pode ser explicado pela alta concentração de lactato (aproximadamente 19 mM) e baixo valor de pH do meio de cultivo provavelmente devido ao metabolismo diferenciado em relação ao consumo de glicose das células mielomatosas e também devido a uma possível baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A análise da Figura 5.21 permite verificar que a concentração de glicose após término do Experimento V-NAKA-10%-a variou de 29,5 mM inicial a 19 mM no final do cultivo, o que sugere que, em estudos posteriores, a concentração inicial deste substrato pode ser adicionado em menores concentrações no intuito de assegurar menor produção de lactato, porém se reveste de grande interesse o estudo preliminar do comportamento metabólico da linhagem em questão frente a diferentes concentrações de substratos.

Um novo experimento foi realizado com intuito de verificar o comportamento de crescimento celular apresentado no Experimento V-NAKA-10%-a. De acordo com os resultados obtidos nos Experimentos II-NAKA-20% e V-NAKA-10%-a foi realizado um cultivo do hibridoma NAKA4-56A137 -  $\alpha$ B em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 10 % v/v de SFB (Gibco™), aproximadamente 28 mM D-Glicose, 6,0 mM L-Glutamina em incubadora de CO<sub>2</sub>, 9,0 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Neste experimento o inóculo foi preparado em frascos de cultura e transferido diretamente ao frasco Spinner devido a inadequado crescimento celular desta cultura em frasco Schott devido a alta sensibilidade da linhagem ao cisalhamento em frasco Schott quando a cultura esta suplementada com a concentração de 10 % de SFB. Os resultados representados nas Figuras 5.23, 5.24, 5.25 apresentam a evolução do crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos durante o cultivo do Experimento V-NAKA-10%-b. O

cultivo foi aerado após 27 horas com sistema de membrana de silicone na qual as vazões que passaram através da membrana variaram de  $0,5 \text{ L.mL}^{-1}$  a  $1,5 \text{ L.mL}^{-1}$ .

Durante o cultivo representado na Figura 5.23 a agitação foi mantida em 40 rpm e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS). Acredita-se que o crescimento celular foi limitado devido a inadequado controle de pH e a falta de homogeneidade da agitação, pois a interação do agitador com sistema de membrana de aeração provocava movimentos bruscos no meio de cultivo o que pode ter prejudicado a cultura.

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial apresentado pela linhagem celular NAKA4-56A137 em frasco Spinner no Experimento V-NAKA-10%-b foi de  $\mu_{\text{máx}} = 0,0283 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 24,53 horas.

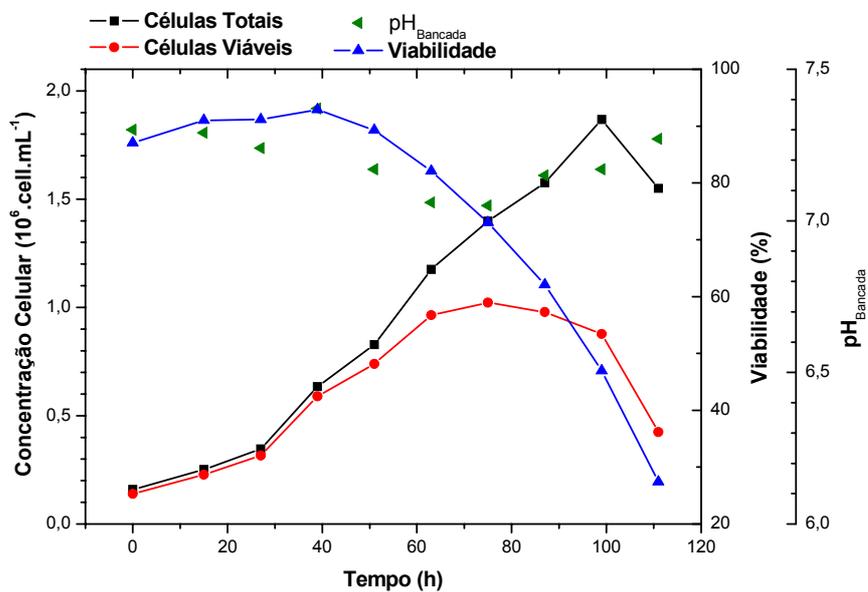


Figura 5.23 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137.

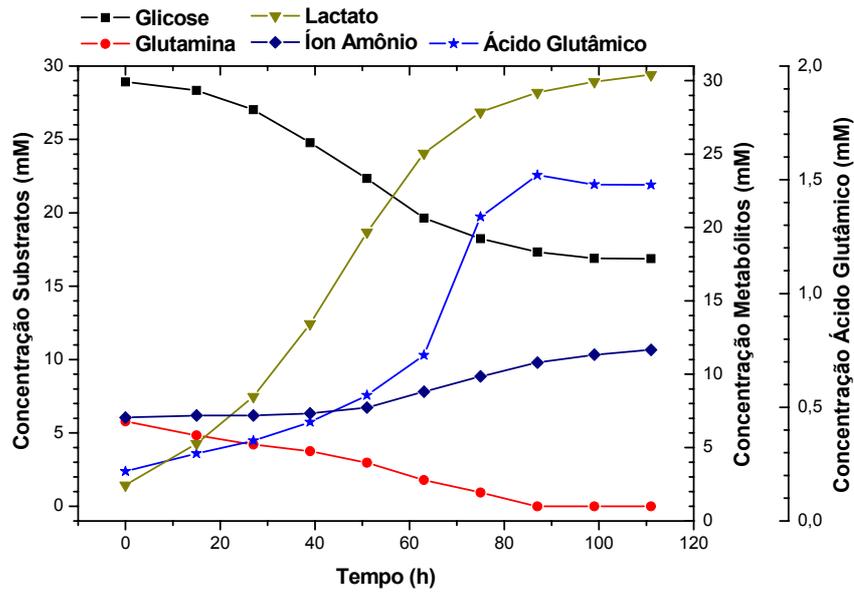


Figura 5.24 - Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico durante o Experimento V-NAKA-10%-b no cultivo do hibridoma NAKA4-56A137.

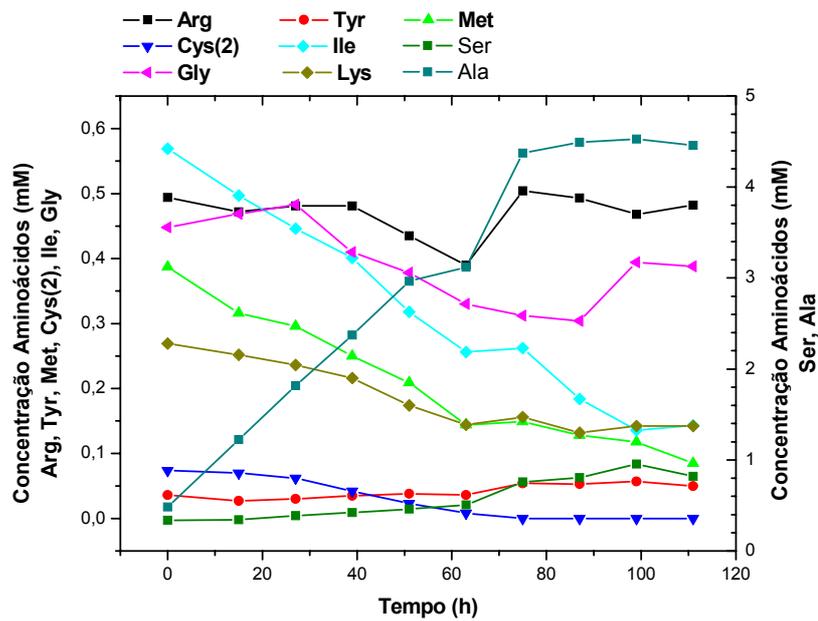


Figura 5.25 - Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-b no cultivo celular do hibridoma NAKA4-56A137.

**Tabela 5.8 – Consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento V-NAKA-10%-b**

Aminoácido	Consumo / Geração (%)
Asp	16,99
Glu	-577,98
Ser	-143,75
Gln	100
Gly	13,39
His	-28,32
Arg	2,43
Thr	37,28
Ala	-821,28
Pro	-0,60
Tyr	-38,89
Val	54,77
Met	78,04
Cys(2)	100
Ile	74,87
Leu	82,40
Phe	59,79
Lys	47,21
Trp	-9,07

Nota: A porcentagem de geração e ou consumo dos aminoácidos foi obtida utilizando-se do ponto inicial e final não levando em conta a oscilação nas concentrações dos mesmos ao longo do cultivo. Os valores positivos denotam o consumo de aminoácidos e os valores negativos indicam a geração de aminoácidos durante o cultivo.

Observa-se pela Figura 5.23 uma diminuição da concentração de células viáveis seguida da queda da viabilidade celular após aproximadamente 63 horas do cultivo o que pode ser explicado pela alta concentração de lactato (aproximadamente 25 mM) e baixo valor de pH do meio de cultivo provavelmente devido ao metabolismo diferenciado em relação ao consumo de glicose das células mielomatosas e também devido a uma possível baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A análise da Figura 5,24 permite verificar que a concentração de glicose após término do Experimento V-NAKA-10%-b variou de 29 mM inicial a 17 mM no final do cultivo, o que sugere que, em estudos posteriores, a concentração inicial deste substrato pode ser adicionado em menores concentrações no intuito de assegurar menor produção de lactato,

porém se reveste de grande interesse o estudo preliminar do comportamento metabólico da linhagem em questão frente a diferentes concentrações de substratos.

Os resultados obtidos no Experimento II-NAKA-20%-b, Experimento V-NAKA-10%-a e Experimento V-NAKA-10%-b foram plotados no gráfico da Figura 5.26 onde é possível comparar as características de crescimento celular da linhagem NAKA4-56A137 em diferentes concentrações de SFB.

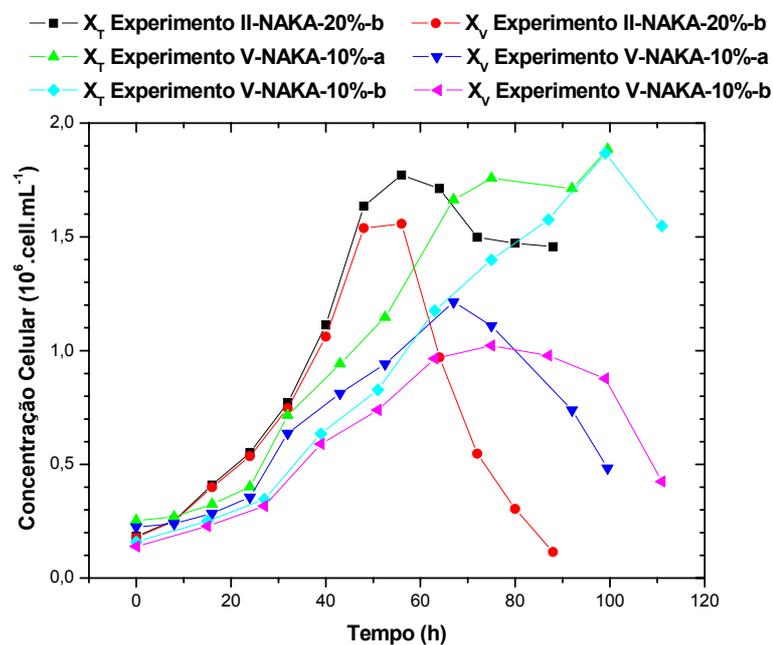


Figura 5.26 – Comparação do comportamento de crescimento do hibridoma NAKA4-56A137 em concentrações de 20 – 10 % v/v de SFB e aumento de 10 % na concentração dos componentes do meio de cultura.

A análise da Figura 5.26 permite concluir que o cultivo do hibridoma murino NAKA4-56A137 apresentou comportamento de crescimento diferenciado em concentrações de 20 % v/v e 10 % v/v de SFB e em meios com diferentes concentrações de alguns aminoácidos o que pode ser evidenciado pelos valores de velocidade específica de crescimento celular nos Experimentos II-NAKA-20%-b, V-NAKA-10%-a e V-NAKA-10%-a apresentados na Tabela 5.9. A adição de nutrientes que foram exauridos do meio de cultivo resultou em aumento de 6 % do número total de células para a linhagem do hibridoma

NAKA4-56A137 o que pode ser verificado pela análise da Figura 5.26, porém a densidade de células viáveis foi inferior o que pode ser explicado pelas possíveis limitações de oxigenação no meio de cultura e ou diferente comportamento metabólico apresentado pela linhagem na presença de maior concentração de D-Glicose e aminoácidos.

**Tabela 5.9 – Comparação da velocidade específica máxima de crescimento celular dos cultivos realizados com a linhagem de hibridoma murino NAKA4-56A137 em meios de cultura com diferentes concentrações de SFB e aminoácidos.**

Experimento	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h <sup>-1</sup> )	Tempo de geração (h)
II-NAKA-20%-b	$\mu_{\text{máx}} = 0,0445$	15,57
V-NAKA-10%-a	$\mu_{\text{máx}} = 0,0284$	24,40
V-NAKA-10%-b	$\mu_{\text{máx}} = 0,0283$	24,53

### 5.2.3 EXPERIMENTO VI-TAN-10%

Durante o procedimento de adaptação da cultura celular ao crescimento em concentração de 10 % v/v SFB a linhagem celular TAN1-112A18 foi ativada em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> utilizando nesta etapa sempre meio de cultura contendo 20 % v/v SFB. Ao recuperar sua viabilidade em torno de 90 - 95 % num período que demandou 11 dias, as células eram inoculadas em 5 mL de meio RPMI 1640 em frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Foi realizada manutenção da cultura a cada 24 horas e a concentração de SFB gradativamente diminuída a cada 48 horas (20,18,16,14,12,10 % v/v SFB) no intuito de condicionar a cultura celular a se propagar em meio com 10 % v/v de SFB. A Figura 5.27 apresenta a evolução da adaptação celular em diferentes concentrações de SFB.

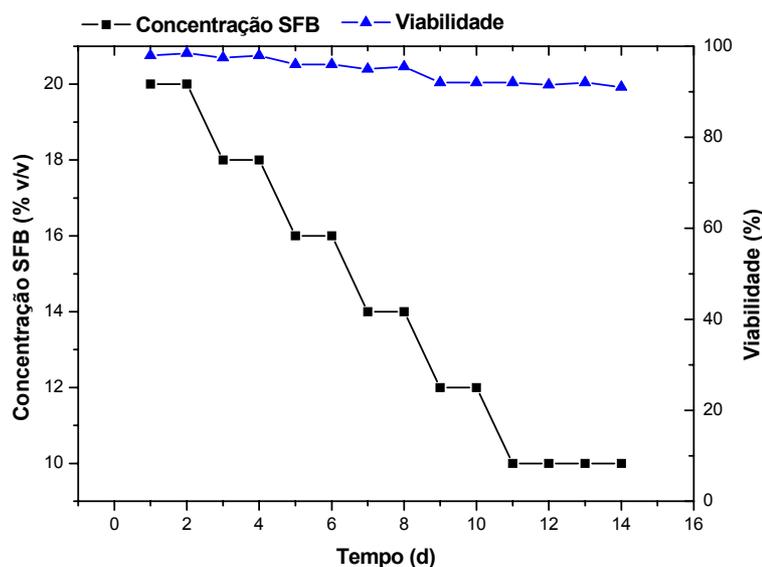


Figura 5.27 – Evolução da viabilidade celular da linhagem TAN1-112A18 em diferentes concentrações de SFB com o intuito de conseguir uma adaptação estável a 10 % v/v de SFB.

De acordo com os resultados obtidos no Experimento III-TAN-20% foi realizado um cultivo do hibridoma TAN1-112A18 -  $\alpha$ AB em frasco Spinner com volume de trabalho 200 mL cultivado a 10 % v/v de SFB (Gibco™), aproximadamente 28 mM D-Glicose, 6,0 mM L-Glutamina em incubadora de CO<sub>2</sub>, 9,0 % v/v do gás CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C, onde a concentração inicial de inóculo foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados representados nas Figuras 5.28, 5.29, 5.30 apresentam a evolução do crescimento celular, consumo e geração de substratos e geração de metabólitos durante o cultivo.

O cultivo foi aerado após 28 horas com sistema de membrana de silicone na qual as vazões que passaram através da membrana variaram de 1,0 L.mL<sup>-1</sup> a 1,5 L.mL<sup>-1</sup>.

Durante o cultivo representado na Figura 5.28 a agitação foi mantida em 28 rpm e o pH do meio de cultivo corrigido com solução de NaOH 0,4 M (solvente PBS). Acredita-se que o crescimento celular foi limitado devido a inadequado controle de pH e a falta de homogeneidade da agitação, pois a interação do agitador com sistema de membrana de

aeração provocava movimentos bruscos no meio de cultivo que pode ter prejudicado a cultura.

A velocidade específica máxima de crescimento celular na fase exponencial apresentado pela linhagem celular TAN1-112A18 em frasco Spinner no Experimento VI-TAN-10% foi de  $\mu_{\text{máx}} = 0,0238 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 29,17 horas.

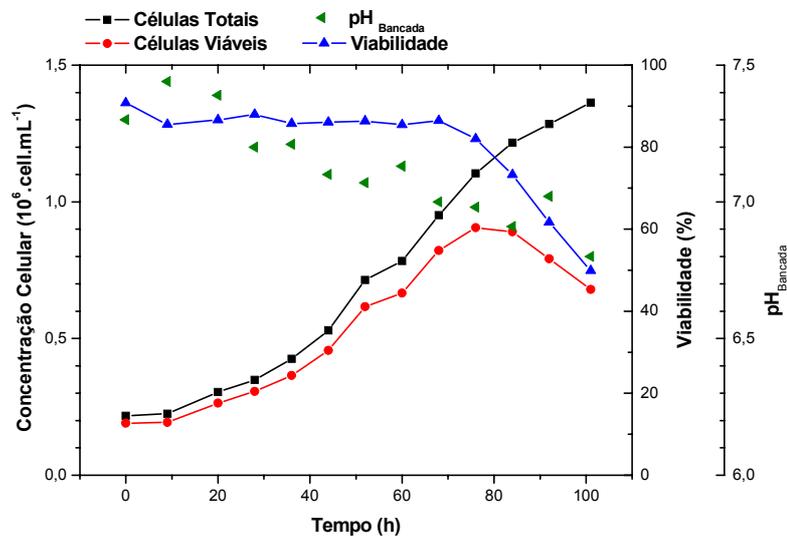


Figura 5.28 – Evolução do crescimento celular, viabilidade e pH durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.

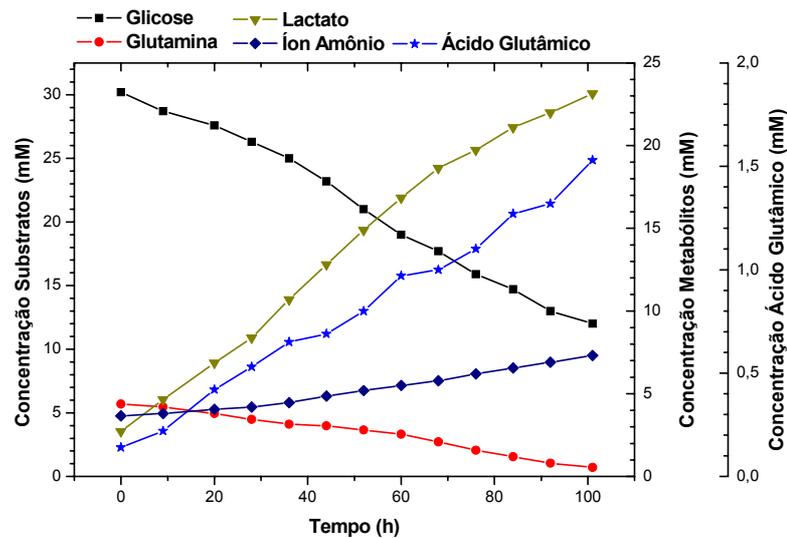


Figura 5.29 – Evolução do consumo de glicose e glutamina e geração de lactato, íon amônio e ácido glutâmico no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.

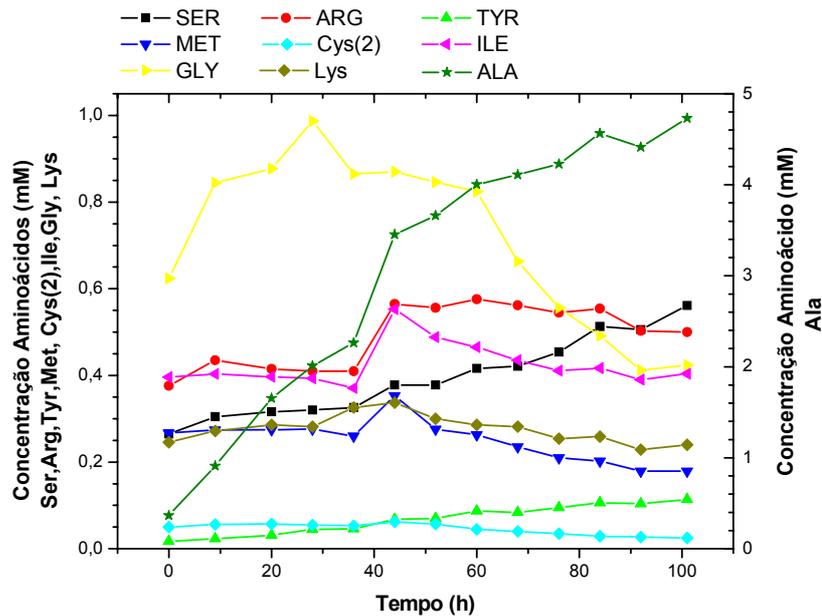


Figura 5.30 – Evolução do consumo e geração de aminoácidos durante o cultivo celular no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18.

Tabela 5.10 – Consumo e geração de aminoácidos durante o Experimento VI-TAN-10%

Aminoácido	Consumo / Geração (%)
Asp	-74,8
Glu	-1016,8
Ser	-111,7
Gln	87,6
Gly	32,0
His	-96,2
Arg	-33,0
Thr	35,4
Ala	-1195,9
Pro	-50,5
Tyr	-570,6
Val	18,8
Met	33,0
Cys(2)	50,0
Ile	-2,0
Leu	19,5
Phe	43,7
Trp	-4,7

Nota: A porcentagem de geração e ou consumo dos aminoácidos foi obtida utilizando-se do ponto inicial e final não levando em conta a oscilação nas concentrações dos mesmos ao longo do cultivo. Os valores positivos denotam o consumo de aminoácidos e os valores negativos indicam a geração de aminoácidos durante o cultivo.

Observa-se pela Figura 5.28 uma diminuição da concentração de células viáveis seguida da queda da viabilidade celular após aproximadamente 76 horas do cultivo o que pode ser explicado pela alta concentração de lactato (aproximadamente 20 mM) e baixo valor de pH do meio de cultivo provavelmente devido ao metabolismo diferenciado em relação ao consumo de glicose das células mielomatosas e também devido a uma possível baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A análise da Figura 5,29 permite verificar que a concentração de glicose após término do Experimento VI-TAN-10% variou de 30 mM inicial a 12 mM no final do cultivo, o que sugere que, em estudos posteriores, a concentração inicial deste substrato pode ser adicionado em menores concentrações no intuito de assegurar menor produção de lactato, porém se reveste de grande interesse o estudo preliminar do comportamento metabólico da linhagem em questão frente a diferentes concentrações de substratos.

Os resultados obtidos no Experimento III-TAN-20% e Experimento VI-TAN-10% foram plotados no gráfico da Figura 5.31 onde é possível comparar as características de crescimento celular da linhagem TAN1-112A18 em diferentes concentrações de SFB.

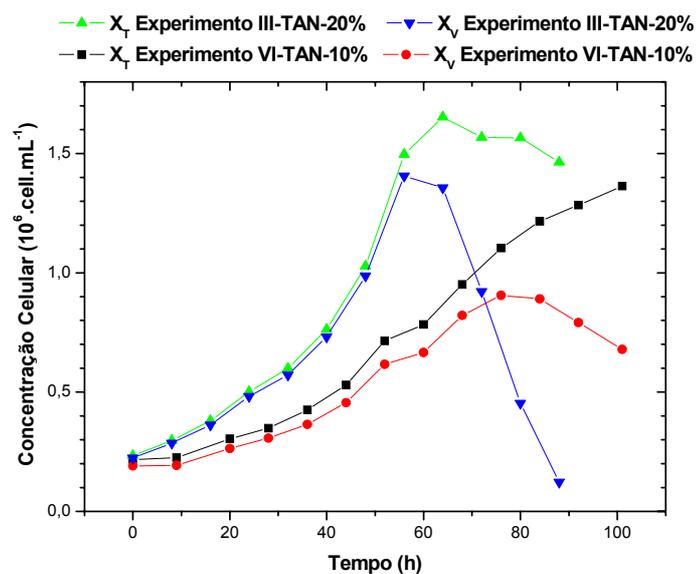


Figura 5.31 – Comparação do comportamento de crescimento do hibridoma TAN1-112A18 em concentrações de 20 – 10 % v/v de SFB e aumento de 10 % na concentração dos componentes do meio de cultura.

A análise da Figura 5.31 permite concluir que o cultivo do hibridoma murino TAN1-112A18 apresentou comportamento de crescimento diferenciado em meios de cultura com diferentes concentrações de SFB e aminoácidos o que pode ser evidenciado pelos valores de velocidade específica de crescimento celular nos Experimentos III-TAN-20% e VI-TAN-10% apresentados na Tabela 5.11. A adição de nutrientes que foram exauridos do meio de cultivo não resultou em aumento de do número total de células para a linhagem do hibridoma TAN1-112A18 o que pode ser verificado pela análise da Figura 5.31, a densidade de células viáveis foi inferior o que pode ser explicado pelas possíveis limitações de oxigenação no meio de cultura e ou diferente comportamento metabólico apresentado pela linhagem na presença de maior concentração de D-Glicose e aminoácidos.

**Tabela 5.11 – Comparação da velocidade específica máxima de crescimento celular dos cultivos realizados com a linhagem de hibridoma murino TAN1-112A18 em meios de cultura com diferentes concentrações de SFB e aminoácidos.**

Experimento	Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ )	Tempo de geração (h)
III-TAN-20%	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,0320$	21,69
VI-TAN-10%	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,0238$	29,17

#### **5.2.4 – COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CRESCIMENTO CELULAR A 10 % v/v SFB DAS TRÊS DIFERENTES LINHAGENS EM ESTUDO**

O comportamento de crescimento celular das três diferentes linhagens de hibridomas murinos em estudo está representado na Figura 5.32 onde podemos observar que as linhagens apresentaram características de crescimento diferenciado o que é comprovado pela diferença dos valores da velocidade específica máxima de crescimento celular calculada durante a fase de crescimento exponencial das três diferentes culturas em estudo que foi comparada na Tabela 5.12. Os resultados encontrados para uma linhagem de hibridoma murino capaz de expressar imunoglobulina contra antígeno A usado na tipagem sanguínea

pelo sistema ABO por SANFELIU *et al.* (1996) cultivada a 1 % SFB v/v e concentrações de substratos que se assemelham as utilizadas neste trabalho foi de uma densidade máxima celular igual a  $0,92 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$  que é inferior aos valores encontrados nesta pesquisa apresentados na Tabela 5.12. Ambos os Experimentos IV-ED-10%, V-NAKA-10%-a, V-NAKA-10%-b e VI-TAN-10% foram suplementados com 10 % v/v SFB (Gibco), aproximadamente 28 mM D-Glucose e 6,0 mM L-Glutamina.

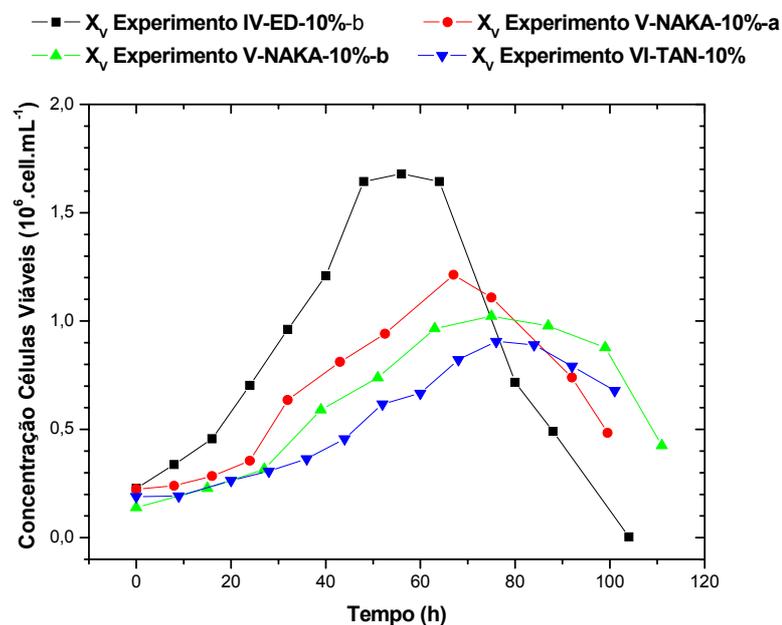


Figura 5.32 – Comparação do comportamento de crescimento em concentração de 10 % v/v de SFB das três linhagens de hibridomas murinos em estudos.

**Tabela 5.12 – Velocidade específica máxima de crescimento celular em concentrações de 20 % v/v de SFB das três diferentes linhagens de hibridomas murinos em estudo.**

Experimento	Linhagem	Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )	Tempo de geração (h)	Densidade máxima celular ( $10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ )
IV-ED-10%-c	ED7-183A12	$\mu_{\text{máx}} = 0,0412$	16,84	$C_{\text{Xmáx}} = 2,36$
V-NAKA-10%-a	NAKA4-56A137	$\mu_{\text{máx}} = 0,0284$	24,40	$C_{\text{Xmáx}} = 1,89$
V-NAKA-10%-b	NAKA4-56A137	$\mu_{\text{máx}} = 0,0283$	24,53	$C_{\text{Xmáx}} = 1,87$
VI-TAN-10%	TAN1-112A18	$\mu_{\text{máx}} = 0,0238$	29,17	$C_{\text{Xmáx}} = 1,36$

Os valores de densidade máxima celular obtidos durante os cultivos apresentaram semelhanças com os valores encontrados na literatura, nos trabalhos de SANFELIU *et al.* (1996), JO *et al.* (1990) e LUAN *et al.* (1987), dentro das inúmeras diferenças de condições de cultivo dos dados comparados. A Tabela 5.13 apresenta a comparação de valores de densidade máxima celular encontrada nos experimentos frente a alguns resultados disponíveis na literatura.

**Tabela 5.13 – Comparação de valores de densidade máxima celular de diferentes linhagens de hibridomas.**

<b>Linhagem</b>	<b>Concentração de SFB (% v/v)</b>	<b>Meio de cultura utilizado</b>	<b>Densidade celular máxima (<math>10^6 \cdot \text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}</math>)</b>
ED7-183 <sup>a</sup> 12	10	RPMI 1640	$C_{X_{\text{máx}}} = 2,36$
NAKA4-56A137	10	RPMI 1640	$C_{X_{\text{máx}}} = 1,89$
TAN1-112A18	10	RPMI 1640	$C_{X_{\text{máx}}} = 1,36$
KB-26.5 <sup>(a)</sup>	1	DMEM	$C_{X_{\text{máx}}} = 0,92$
ATCC HB (14-4-4S) <sup>(b)</sup>	10	DMEM	$C_{X_{\text{máx}}} = 1,5$
2c3.1 <sup>(c)</sup>	10	RPMI 1640	$C_{X_{\text{máx}}} = 2,3$

<sup>(a)</sup> SANFELIU *et al.* (1996), <sup>(b)</sup> LUAN *et al.* (1987), <sup>(c)</sup> JO *et al.* (1990)

## 6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1 – Os resultados sugerem que o crescimento celular dos três hibridomas em frasco Spinner provavelmente esteja sendo limitado devido às dificuldades de transferência de oxigênio da fase gasosa para o meio de cultivo, as limitações em manter o pH do meio de cultivo em valor ideal para crescimento celular, aos altos valores de lactato e íon amônio produzidos durante os experimentos e à limitação por depleção de aminoácidos presentes no meio de cultura.

2 - Para os experimentos conduzidos com a linhagem do hibridoma murino ED7-183A12 foi identificada total exaustão dos aminoácidos glutamina, cisteína, metionina e serina no Experimento I-ED-20%. Já no Experimento IV-ED-10%-b não foi detectada exaustão de nenhum dos aminoácidos presentes no meio de cultura. A concentração de lactato produzido no Experimento I-ED-20% alcançou valores de aproximadamente 25,5 mM, já no Experimento IV-ED-10%-b alcançou valores de aproximadamente 27,8 mM. A concentração do íon amônio no final do cultivo alcançou valores de 10,2 e 12,2 mM para os Experimentos I-ED-20% e IV-ED-10%-b, respectivamente. O ligeiro aumento na concentração dos metabólitos tóxicos, tanto lactato quanto íon amônio, pode ser explicado pelo aumento de 17 % na concentração de células. A diminuição da velocidade específica máxima de crescimento celular pode ser explicada pela presença de menor concentração de SFB, pois é conhecido que o SFB possui importantes fatores de crescimento celular.

3 - Nos experimentos conduzidos com a linhagem do hibridoma murino NAKA4-56A137 foi identificada total exaustão dos aminoácidos glutamina, cisteína e histidina no Experimento II-NAKA-20%-b e nos Experimentos V-NAKA-10%-a e V-NAKA-10%-b foi

identificada completa exaustão dos aminoácidos glutamina e cisteína presentes no meio de cultura. A concentração de lactato produzida no Experimento II-NAKA-20%-b alcançou valores de aproximadamente 45 mM, já nos Experimentos V-NAKA-10%-a e V-NAKA-10%-b alcançou valores de aproximadamente 27,5 e 30,5 mM, respectivamente. A concentração do íon amônio no final do cultivo alcançou valores de 9,7, 11,3 e 11,7 mM para os Experimentos II-NAKA-20%-b, V-NAKA-10%-a e V-NAKA-10%-b, respectivamente. O ligeiro aumento na concentração dos metabólitos tóxicos, tanto lactato quanto íon amônio, pode ser explicado pelo aumento de 6 % na concentração de células. A diminuição da velocidade específica máxima de crescimento celular pode ser explicada pela presença de menor concentração de SFB, pois como já explicado para o caso da linhagem ED7-183A12 é conhecido que o SFB possui importantes fatores de crescimento celular e permitir melhor crescimento e propagação da cultura.

4 - Nos experimentos realizados com a linhagem do hibridoma murino TAN1-112A18 foi identificada total exaustão do aminoácido glutamina e exaustão de metionina e cisteína no Experimento III-TAN-20% e no Experimento VI-TAN-10% não foi identificada exaustão de nenhum dos aminoácidos analisados, porém os aminoácidos glutamina e cisteína foram consumidos acima de 80 e 50 % respectivamente dos valores iniciais presentes no meio de cultura. A concentração de lactato produzida no Experimento III-TAN-20% alcançou valores de aproximadamente 26,3 mM, já no Experimento VI-TAN-10% alcançou valores de aproximadamente 23,15 mM. A concentração do íon amônio no final do cultivo alcançou valores de 13,5 e 7,3 mM para os Experimentos III-TAN-20% e VI-TAN-10%, respectivamente. A diminuição da velocidade específica máxima de crescimento celular pode ser explicada, à semelhança dos outros dois hibridomas, pela presença de menor concentração de SFB, pois é conhecido que o SFB possui importantes fatores de crescimento celular e permitir melhor crescimento e propagação da cultura.

5 - Tanto os cultivos realizados em concentrações de 20 % v/v de SFB como os cultivos com células adaptadas ao crescimento a 10 % v/v SFB revelaram a necessidade de balanceamento de aminoácidos no meio de cultura para melhorar a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e densidade máxima de células ( $C_{X\text{máx}}$ ).

## 7 - GLOSSÁRIO

**Anticorpo:** molécula baseada em proteínas complexas produzida pelos linfócitos B que identificam e ajudam a eliminar agentes estranhos e infecciosos do organismo. Anticorpos possuem a forma de Y, possuindo dois grupos de ramos ligados por uma haste. Os ramos do Y (Fab) são assim designadas pelas regiões variáveis, as extremidades dos ramos contêm regiões de reconhecimento do antígeno (regiões de determinada complementariedade – CDRs) e a haste (Fc) é uma região constante. A região constante desperta a função efetora (fagocitose, citólise por linfócitos citotóxicos ou início de uma cascata complementar que permite a lise da célula) por ligação do complexo a outras células do sistema imune.

**Anticorpo Monoclonal:** originalmente, anticorpos monoclonais são anticorpos produzidos por um simples linfócito B. Atualmente, manipulações genéticas permitem genes de diversas origens de linfócitos B (por exemplo, murino e humano) serem combinados. Anticorpos monoclonais de uma seqüência definida de peptídeos possuem regiões de reconhecimento do antígeno idênticas e atacam o mesmo sítio (epitope) de um antígeno.

**Anticorpo monoclonal murino:** um anticorpo monoclonal derivado inteiramente de um camundongo, gerado da fusão de células de um mieloma murino com linfócito B murino.

## 8 – BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular*. 5. ed. Local: Elsevier, 2005.

BACKER, M. P. et al. Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p. 993-1000, 1988.

BIBILA, T. A.; ROBINSON, D. K. In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnology. Progress*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 1995.

CAPIAUMONT, J. et al. Methods for reducing the ammonia in hibridoma cell cultures. *Journal of Biotechnology*, v. 39, p. 49-58, 1995.

CHUCK, A. S.; PALSSON, B. O. Population balance between producing and nonproducing hybridoma clones is very sensitive to serum level, state of inoculum and medium composition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, p. 354-360, 1992.

CHU, L.; ROBINSON, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 180-187, 2001.

DEZENGOTITA, V.; KIMURA, R.; MILLER, W. M. Effects of CO<sub>2</sub> and osmolality on hibridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. *Cytotechnology*, v. 28, p. 213-227, 1998.

DOYLE, C.; BUTLER, M. The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. *Journal of Biotechnology*, v. 15, p. 91-100, 1990.

DUVAL, D. et al. Factors controlling cell proliferation and antibody production in mouse hybridoma cells: I. Influence of the amino acid supply. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 561–570, 1991.

DUVAL, D. et al. Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. *Hybridoma*, v. 11, p. 311–322, 1992.

EUI-CHEOL, J. et al. Repeated fed-batch culture of hibridoma cells in nutrient-fortified high-density medium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, n. 10, p. 1229-1237, 1993.

FRAME, K. K.; HU, W. S. The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 469-476, 1990.

FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 3. ed., Local: WILEY-LISS, 1994.

GAMBHIR, A.; EUROPA, A. F.; HU, W. Alteration of cellular metabolism by consecutive fed-batch cultures of mammalian cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 87, n. 6, p. 805-810, 1999.

GLACKEN, M. W.; FLEISCHAKER, R. J.; SINSKEY, A. J. Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 28, p. 1376-1389, 1986.

GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolic engineering of animal cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 24, p. 289-298, 2002.

GOERGEN, J. L., MARC, A., ENGASSER, J. M. Comparison of specific rates of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous cultures. *Cytotechnology*, v. 10, p. 147-155, 1992.

GRIFFITHS, J. B. Animal cell culture processes, batch or continuous? *Journal of Biotechnology*, v. 22, p. 21-30, 1992.

HAYTER, P. M.; KIRKBY, N. F.; SPIER, R. Relationship between hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 454-461, 1992.

HU, W. S. et al. Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Developments in Biological Standardization*, v. 66, p. 279-290, 1987.

JEONG, Y.; WANG, S. S. Role of glutamine in hybridoma cell culture: Effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 47-55, 1995.

JO, E. C. et al. Balanced nutrient fortification enables high density hybridoma cell culture in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 36, p. 717-722, 1990.

JO, E. C.; KIM, D.; MOON H. M. Step-fortifications of nutrients in mammalian cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, p. 1218-1228, 1993.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495-497, 1975.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 59, p. 135-142, 2002.

KUNDU, P. K.; PRASAD, N. S.; DATTA, D. Monoclonal antibody: high density culture of hybridoma cells and downstream processing for IgG recovery. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 36, p. 125-135, 1998.

LAMBERT, K.; PIRT, S. J. The quantitative requirements of human diploid cells (strain MRC-5) for amino acids, vitamins and serum. *Journal of Cell Science*, v. 17, p. 397-411, 1975.

LEGAZPI, L. et al. Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: Substrate and agitation effects. *Biochemical Engineering Journal*, v. 26, p. 122-130, 2005.

LEIST, C. H.; MEYER, H. P.; FIECHTER, A. Potential and problems of animal cells in suspension culture. *Journal of Biotechnology*, v. 15, p. 1-46, 1990.

LUAN, Y. T.; MUTHARASAN, R.; MAGEE, W. E. Effect of various glucose/glutamina ratios on hybridoma growth, viability and monoclonal antibody formation. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 8, p. 535-539, 1987a.

LUAN, Y. T.; MUTHARASAN, R.; MAGEE, W. E. Strategies to extend longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 10, p. 691-696, 1987b.

LUAN, Y. T.; MUTHARASAN, R.; MAGEE, W. E. Factors governing lactic acid formation in long term cultivation of hybridoma cells. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 11, p. 751-756, 1987c.

MARTIN, Y.; VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, v. 26, p. 7481-7503, 2005.

McQUEEN, A.; BAILEY, J. E. Effect of ammonium ion and extra-cellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 1067-1077, 1990.

MILLER, W. M.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, n. 8, p. 947-965, 1988.

MUSGROVE, E.; SEAMAN, M.; HEDLEY, D. Relationship between cytoplasmic pH and proliferation during exponential growth and cellular quiescence. *Experimental Cell Research*, v. 172, p. 65-75, 1987.

NEWLAND, M.; GREENFIELD, P. F.; REID, S. Hybridoma growth limitations: the role of energy metabolism and ammonia production. *Cytotechnology*, v. 3, n. 3, p. 215-229, 1990.

NEWLAND, M. et al. Ammonia inhibition of hybridoma propagated in batch, fed-batch and continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 434-438, 1994.

NOE, W. et al. Aspects of continuous culture versus batch mode for animal cells in industrial processes. In: SPIER, R. E.; GRIFFITHS, J. B.; MACDONALD, C. *Animal cell technology; developments, processes and products*. Local: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1992. p. 354-359.

OMASA, T. et al. Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate controlled fed-batch operation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, p. 556-564, 1992.

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

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effects of initial cell density on hybridoma growth, metabolism and monoclonal antibody production. *Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 259-278, 1990b.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, p. 989-993, 1991.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effect of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, p. 418-431, 1992.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics – success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 12, p. 1513–1519, 2004.

PAVLOU, A. K.; BELSEY, M. J. The therapeutic antibodies market to 2008. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 389–396, 2005.

PHILLIPS, H. A. et al. Effect of oxygen on antibody productivity in hybridoma culture. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 11, p. 745-750, 1987.

REICHERT, J. M. et al. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnology*, v. 23, n. 9, p. 1073-1078, 2005.

REUVENY, S. et al. Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of Immunological Methods*, v. 86, p. 53-59, 1986.

ROUGER, P.; PIRENNE, F. N.; LE PENNEC, P.Y. Advances in the use of monoclonal antibodies for blood group testing. *Transfusion Clinique et Biologique*, v. 4, n. 4, p. 345-349, 1997.

SANFELIU, A. et al. Analysis of nutritional factors and physical conditions affecting growth and monoclonal antibody production of the hibridoma KB-26.5 cell line. *Biotechnology Progress*, v. 12, p. 209-216, 1996.

SANFELIU, A. et al. Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 421-428, 1997.

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

TAKAGI, M.; OHARA, K.; YOSHIDA, T. Effect of hydrostatic pressure on hybridoma cell metabolism. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 80, n. 6, p. 619-621, 1995.

WERNER, R. G. et al. Safety and economic aspects of continuous mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology*, v. 22, p. 51-68, 1992.

XIE, L.; WANG, D. I. C. Fed-batch cultivation of animal cells using different medium desing concepts and feeding strategies. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 1175-1189, 1994.

ZHANG, L.; SHEN, H.; ZHANG, Y. Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 79, p. 171-181, 2004.

ZHOU, W. C.; JUTT, R.; HU, W. S. High viable cell concentration fed-batch culture of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 46, p. 579-587, 1995.

## APÊNDICE A

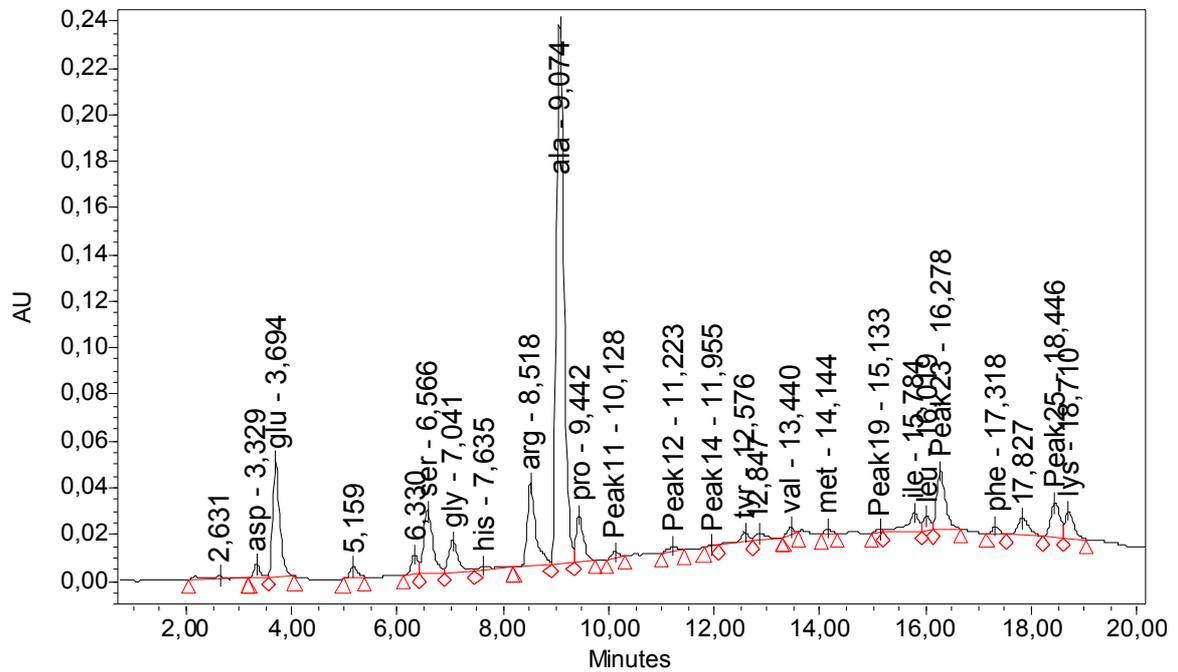


Figura A.1 - Cromatograma da amostra do cultivo do hibridoma NAKA4-56A137 no Experimento V-NAKA-10%-a obtido por HPLC para determinação da concentração de aminoácidos após 92 horas do início do experimento.

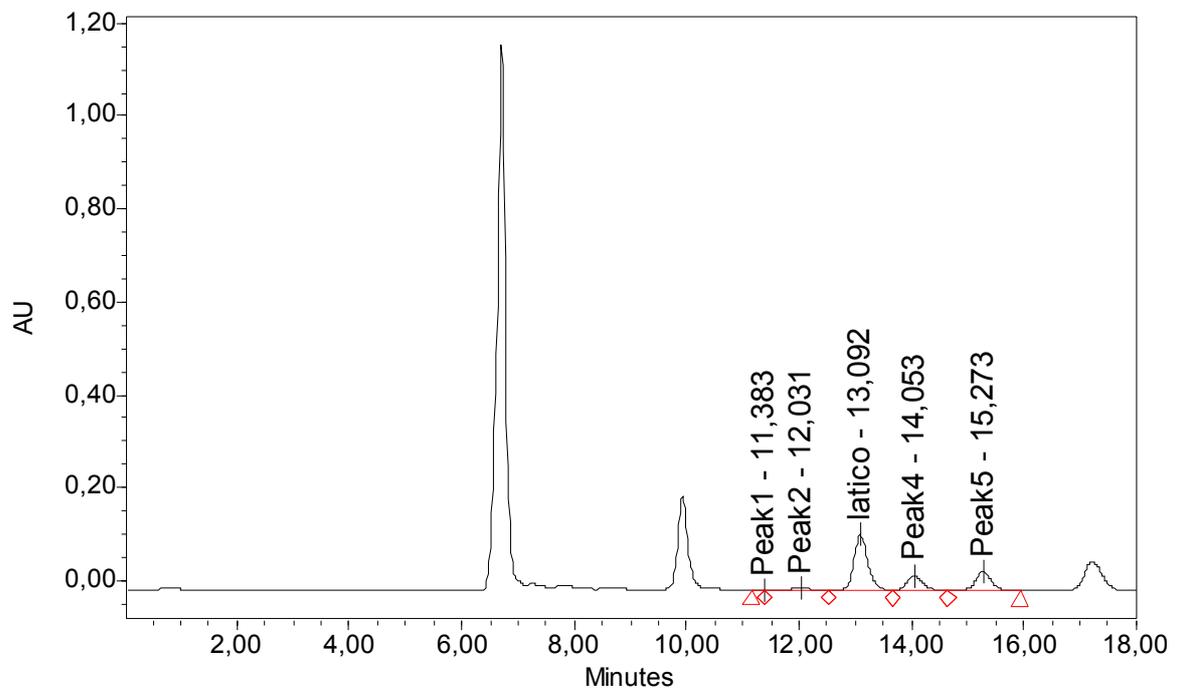


Figura A.2 - Cromatograma da amostra do cultivo do hibridoma TAN1-112A18 no Experimento VI-TAN-10% obtido por HPLC para determinação da concentração de lactato após 84 horas do início do experimento.

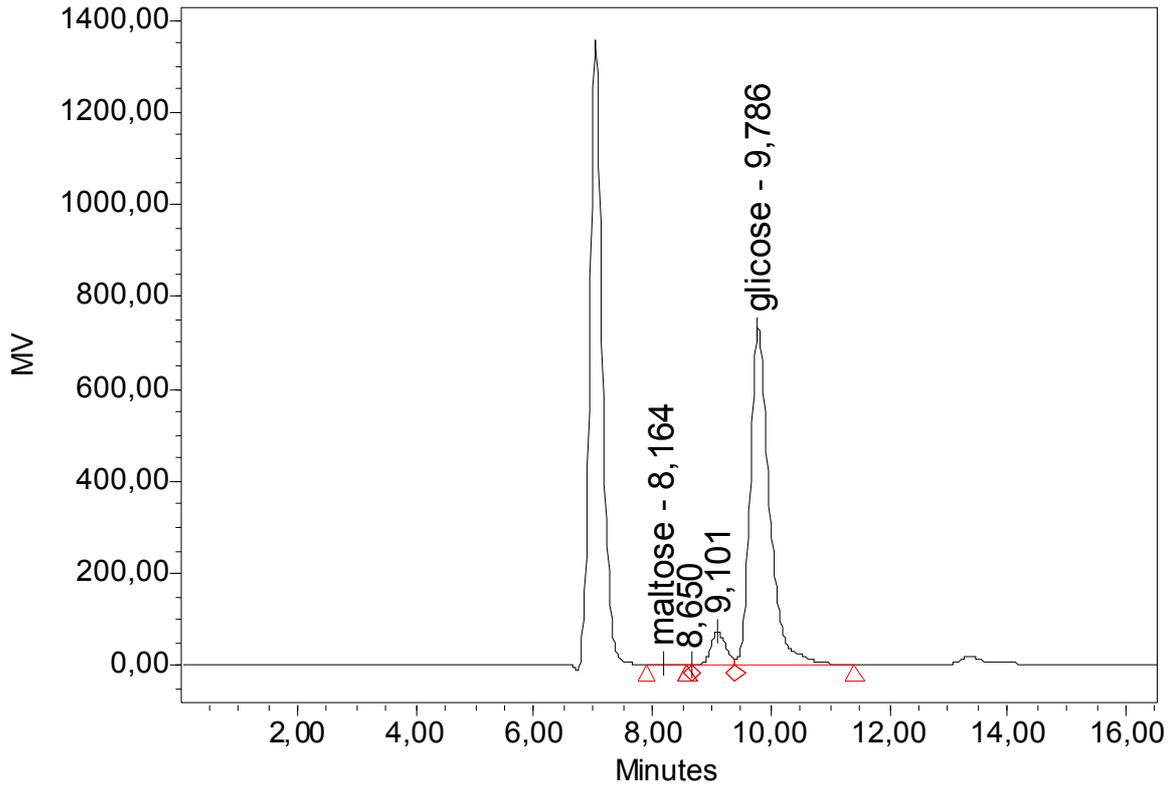


Figura A.3 - Cromatograma da amostra do cultivo do hibridoma NAKA4-56A137 no Experimento V-NAKA-10%-b obtido por HPLC para determinação da concentração de glicose no tempo inicial do experimento.

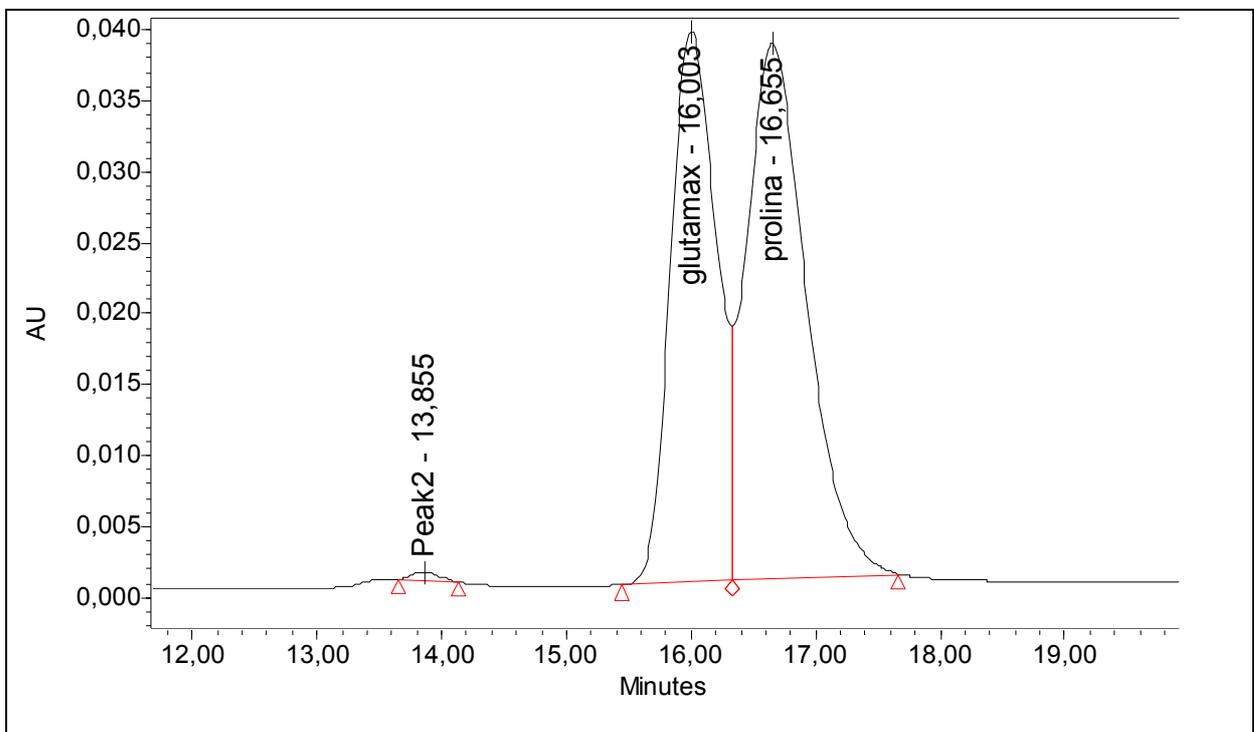


Figura A.4 - Cromatograma da amostra do padrão de Glutamx (GIBCO™) obtido por HPLC para determinação da concentração de glutamina nos experimentos.

## APÊNDICE B

**Tabela B.1 – Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Totais (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Viáveis (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>pH</b>
0	0,217	0,205	94,59	7,4
10,42	0,446	0,428	95,86	-
27,33	0,86	0,826	96,06	6,94
35,5	1,367	1,304	95,35	-
48,20	2,008	1,875	93,4	6,3
60	1,9	1,49	78,42	-
75	1,89	5,186	27,44	6,5
84	1,245	5,455	0,44	-

**Tabela B.2 – Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o hibridoma ED7-183A12**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (mM)</b>	<b>Glutamina (mM)</b>	<b>Lactato (mM)</b>	<b>Íon Amônio (mM)</b>	<b>Ácido Glutâmico (mM)</b>
0	22,28	3,658	4,053	8,53	0,270
27,33	15,96	1,978	15,42	8,92	0,395
48,20	7,246	0,221	25,17	9,25	0,358
60	3,808	0	25,47	9,89	0,389
75	0,65	0	22,41	10,03	0,365
84	0,59	0	18,38	10,17	0,368

**Tabela B.3 – Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento I-ED-20% realizado com o híbrido ED7-183A12**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Asp (mM)</b>	<b>Ser (mM)</b>	<b>His (mM)</b>	<b>Arg (mM)</b>	<b>Thr (mM)</b>	<b>Ala (mM)</b>	<b>Pro (mM)</b>	<b>Tyr (mM)</b>	<b>Val (mM)</b>	<b>Met (mM)</b>	<b>Cys (2) (mM)</b>	<b>Ile (mM)</b>	<b>Leu (mM)</b>	<b>Phe (mM)</b>	<b>Lys (mM)</b>	<b>Gly (mM)</b>
0	0,191	0,240	0,038	1,178	0,153	0,259	0,359	0,266	0,332	0,143	0,0755	0,427	1,489	0,155	0,286	0
27,33	0,207	0,246	0,0562	0,714	0,132	0,861	0,343	0,189	0,229	0,0653	0,0488	0,283	0,760	0,116	0,188	0
48,20	0,186	0,143	0,0268	0,415	0,0583	1,351	0,332	0,101	0,088	0,0298	0	0,140	0,975	0,0509	0,0234	0,341
60	0,202	0,185	0,131	0,385	0,0605	1,663	0,331	0,0904	0,0852	0	0	0,109	0,119	0,0578	0,0403	7,590
75	0,176	0,010	0,0335	0,270	0,0537	1,596	0,389	0,0628	0,0819	0	0	0,0673	1,210	0,0485	0,0339	8,157
84	0,175	0,010	0,0225	0,239	0,0451	1,616	0,406	0,061	0,0889	0	0	0,071	1,344	0,0493	0,0379	8,155

**Tabela B.4 – Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento II-NAKA-20%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Totais (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Viáveis (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>pH</b>
0	0,184	0,179	97,28	7,95
8	0,253	0,25	98,68	7,85
16	0,409	0,4	97,72	7,51
24	0,551	0,536	97,18	7,35
32	0,771	0,747	96,89	7,29
40	1,113	1,061	95,35	7,17
48	1,635	1,539	94,11	6,98
56	1,772	1,557	87,86	6,87
64	1,713	0,971	56,65	7,20
72	1,498	0,547	36,5	6,91
80	1,472	0,304	20,65	6,85
88	1,456	0,114	7,85	7,21

**Tabela B.5 – Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento II-NAKA-20%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (mM)</b>	<b>Glutamina (mM)</b>	<b>Lactato (mM)</b>	<b>Íon Amônio (mM)</b>	<b>Ácido Glutâmico (mM)</b>
0	26,67	4,008	5,305	6,75	0,116
8	24,45	3,368	7,832	6,9	0,157
16	23,12	3,049	11,37	6,93	0,204
24	21,13	2,643	15,06	6,94	0,212
32	19,36	1,955	19,64	7,6	0,275
40	16,06	1,151	25,77	7,88	0,33
48	13,6	0	31,15	8,16	0,258
56	12,01	0	35,05	8,78	0,38
64	10,66	0	38,99	9,07	0,357
72	10,05	0	41,03	9,15	0,362
80	9,23	0	44,17	9,29	0,365
88	8,72	0	45,2	9,74	0,395

**Tabela B.6 – Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento II-NAKA-20%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Asp (mM)</b>	<b>Ser (mM)</b>	<b>His (mM)</b>	<b>Arg (mM)</b>	<b>Thr (mM)</b>	<b>Ala (mM)</b>	<b>Pro (mM)</b>	<b>Tyr (mM)</b>	<b>Val (mM)</b>	<b>Met (mM)</b>	<b>Cys (2) (mM)</b>	<b>Ile (mM)</b>	<b>Leu (mM)</b>	<b>Phe (mM)</b>	<b>Lys (mM)</b>	<b>Gly (mM)</b>
0	0,058	0,288	0,086	0,117	0,315	0,863	0,194	0,199	0,391	0,124	0,075	0,523	0,493	0,182	0,347	0,371
8	0,082	0,245	0,111	0,145	0,398	0,724	0,254	0,17	0,324	0,090	0,051	0,425	0,404	0,158	0,308	0,398
16	0,092	0,239	0,012	0,09	0,641	0,457	0,229	0,177	0,311	0,123	0,062	0,391	0,366	0,154	0,255	0,325
24	0,066	0,282	0,013	0,107	0,901	0,441	0,242	0,194	0,298	0,118	0,048	0,356	0,319	0,150	0,244	0,328
32	0,092	0,305	0,009	0,07	1,1	0,517	0,227	0,148	0,234	0,084	0,047	0,299	0,258	0,132	0,210	0,329
40	0,085	0,327	0,007	0,079	0,771	1,15	0,23	0,124	0,159	0,031	0,014	0,212	0,170	0,081	0,155	0,345
48	0,055	0,297	0,025	0,059	0,88	1,2	0,223	0,118	0,144	0,030	0,014	0,177	0,101	0,074	0,172	0,347
56	0,065	0,324	0,015	0,053	0,981	1,209	0,253	0,115	0,141	0,021	0,008	0,151	0,095	0,076	0,168	0,438
64	0,075	0,336	0,015	0,081	0,817	1,247	0,257	0,117	0,138	0,012	0,007	0,147	0,097	0,078	0,147	0,484
72	0,045	0,386	0,01	0,08	0,912	1,397	0,284	0,098	0,151	0	0	0,113	0,078	0,059	0,138	0,513
80	0,052	0,334	0	0,081	1,08	1,56	0,228	0,122	0,157	0	0,033	0,161	0,110	0,092	0,158	0,549
88	0,059	0,358	0	0,092	1,035	1,84	0,29	0,100	0,125	0,006	0	0,109	0,083	0,055	0,158	0,627

**Tabela B.7 – Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento III-TAN-20% realizado com o hibridoma TAN1-112A18**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Totais (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Viáveis (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>pH</b>
0	0,233	0,224	96	7,35
8	0,298	0,286	96,05	7,33
16	0,380	0,363	95,61	7,31
24	0,502	0,482	96,01	7,28
32	0,599	0,572	95,45	7,24
40	0,763	0,732	95,93	7,22
48	1,028	0,988	96,11	6,70
56	1,496	1,406	93,98	6,57
64	1,652	1,356	82,06	6,64
72	1,568	0,921	58,74	6,47
80	1,566	0,454	28,95	6,29
88	1,463	0,124	8,44	6,68

**Tabela B.8 – Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento III-TAN-20% realizado com o hibridoma TAN1-112A18**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (mM)</b>	<b>Glutamina (mM)</b>	<b>Lactato (mM)</b>	<b>Íon Amônio (mM)</b>	<b>Ácido Glutâmico (mM)</b>
0	27,27	3,89	5,13	5,45	0,164
8	27,36	3,41	7,99	7,43	0,239
16	24,98	3,11	10,10	8,35	0,407
24	23,08	2,27	12,47	8,90	0,444
32	20,82	1,6	15,99	9,56	0,720
40	17,53	0,79	20,75	10,10	0,897
48	14,28	0,20	23,68	10,82	0,813
56	11,41	0	24,88	11,23	0,938
64	10,01	0	25,44	11,45	0,822
72	7,92	0	26,01	12,10	0,859
80	5,61	0	26,15	12,90	0,829
88	3,21	0	26,33	13,50	0,912

**Tabela B.9 – Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento III-TAN-20% realizado com o hibridoma TAN1-112A18**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Asp (mM)</b>	<b>Ser (mM)</b>	<b>His (mM)</b>	<b>Arg (mM)</b>	<b>Thr (mM)</b>	<b>Ala (mM)</b>	<b>Pro (mM)</b>	<b>Tyr (mM)</b>	<b>Val (mM)</b>	<b>Met (mM)</b>	<b>Cys (2) (mM)</b>	<b>Ile (mM)</b>	<b>Leu (mM)</b>	<b>Phe (mM)</b>	<b>Lys (mM)</b>	<b>Gly (mM)</b>
0	0,0878	0,169	0,100	0,168	0,133	0,470	0,177	0,137	0,274	0,0923	0,0689	0,403	0,382	0,145	0,336	0,330
8	0,0872	0,165	0,180	0,148	0,127	0,537	0,177	0,131	0,267	0,0822	0,0637	0,374	0,368	0,140	0,364	0,310
16	0,0994	0,162	0,107	0,146	0,132	0,659	0,178	0,135	0,257	0,0814	0,0651	0,366	0,369	0,141	0,367	0,303
24	0,0854	0,161	0,149	0,121	0,118	0,760	0,172	0,119	0,229	0,0681	0,0575	0,338	0,322	0,129	0,338	0,272
32	0,114	0,166	0,145	0,115	0,110	0,944	0,171	0,112	0,213	0,0555	0,0564	0,313	0,313	0,121	0,207	0,271
40	0,123	0,168	0,0958	0,103	0,105	1,106	0,160	0,106	0,182	0,0402	0,0543	0,294	0,271	0,107	0,194	0,252
48	0,102	0,146	0,0760	0,0975	0,0912	1,286	0,184	0,0729	0,106	0,0447	0,0289	0,229	0,217	0,0852	0,438	0,247
56	0,125	0,165	0,0848	0,0914	0,0754	1,403	0,158	0,0688	0,117	0,0123	0,0347	0,272	0,219	0,0843	0,317	0,271
64	0,104	0,194	0,0897	0,0968	0,242	1,617	0,182	0,0699	0,126	0,0119	0,0302	0,274	0,221	0,0838	0,125	0,328
72	0,115	0,120	0,0933	0,0930	0,0474	1,705	0,174	0,0633	0,128	0,0122	0,0239	0,264	0,221	0,087	0,151	0,355
80	0,102	0,191	0,0926	0,0938	0,0410	1,735	0,203	0,0835	0,147	0,0130	0,0240	0,254	0,224	0,0856	0,135	0,372
88	0,115	0,205	0,0873	0,0966	0,0481	1,877	0,209	0,0870	0,152	0,0124	0,0244	0,254	0,227	0,0892	0,170	0,404

**Tabela B.10 – Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o hibridoma ED7-183A12**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Totais (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Viáveis (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>pH</b>
0	0,259	0,228	91,13	7,36
8	0,366	0,337	92,21	7,25
16	0,491	0,457	93,20	7,23
24	0,758	0,703	92,74	7,05
32	1,026	0,961	93,72	7,18
40	1,312	1,209	92,14	6,70
48	1,833	1,644	89,67	6,50
56	2,059	1,679	81,52	6,59
64	2,356	1,644	69,79	6,47
80	1,905	0,717	37,63	6,28
88	2,101	0,491	23,35	6,45
104	1,955	0,00375	0,19	6,84

**Tabela B.11 – Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o hibridoma ED7-183A12**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (mM)</b>	<b>Glutamina (mM)</b>	<b>Lactato (mM)</b>	<b>Íon Amônio (mM)</b>	<b>Ácido Glutâmico (mM)</b>
0	29,31	5,62	2,97	7,37	0,197
8	28,25	5,05	5,23	7,51	0,265
16	26,20	4,12	8,80	7,76	0,318
24	24,07	3,29	12,70	8,00	0,367
32	20,68	2,66	18,33	8,43	0,440
40	16,89	2,26	24,62	8,62	0,541
48	13,93	1,81	27,30	9,02	0,593
56	11,57	1,30	27,82	9,36	0,634
64	9,31	1,04	27,60	9,79	0,684
80	4,80	0,54	26,27	10,79	0,735
88	2,05	0,41	25,75	11,28	0,777
104	0,95	0,26	22,42	12,15	0,777

**Tabela B.12 – Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento IV-ED-10%-c realizado com o híbrido ED7-183A12**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Asp (mM)</b>	<b>Ser (mM)</b>	<b>His (mM)</b>	<b>Arg (mM)</b>	<b>Thr (mM)</b>	<b>Ala (mM)</b>	<b>Tyr (mM)</b>	<b>Val (mM)</b>	<b>Met (mM)</b>	<b>Cys (2) (mM)</b>	<b>Ile (mM)</b>	<b>Leu (mM)</b>	<b>Phe (mM)</b>	<b>Lys (mM)</b>	<b>Gly (mM)</b>	<b>Trp (mM)</b>
0	0,369	0,290	0,020	0,421	0,215	0,469	0,034	0,143	0,298	0,064	0,483	0,446	0,143	0,238	0,232	0,826
8	0,383	0,326	0,039	0,461	0,287	0,785	0,044	0,149	0,302	0,064	0,475	0,445	0,153	0,250	0,331	0,751
16	0,396	0,300	0,042	0,462	0,230	1,149	0,040	0,141	0,289	0,065	0,463	0,416	0,150	0,237	0,396	0,749
24	0,396	0,317	0,034	0,453	0,240	1,512	0,040	0,125	0,242	0,059	0,407	0,357	0,127	0,201	0,323	0,861
32	0,386	0,311	0,030	0,451	0,239	2,041	0,045	0,109	0,188	0,052	0,377	0,324	0,138	0,168	0,371	0,896
40	0,392	0,327	0,035	0,475	0,267	2,780	0,047	0,115	0,242	0,047	0,384	0,310	0,126	0,129	0,405	0,795
48	0,380	0,352	0,032	0,462	0,284	3,278	0,050	0,087	0,154	0,034	0,320	0,244	0,087	0,100	0,377	0,717
56	0,369	0,403	0,030	0,466	0,204	3,919	0,050	0,077	0,136	0,028	0,306	0,225	0,073	0,084	0,369	0,709
64	0,359	0,427	0,027	0,465	0,271	4,144	0,053	0,069	0,111	0,023	0,276	0,200	0,057	0,077	0,333	0,727
80	0,368	0,454	0,022	0,455	0,244	4,299	0,050	0,068	0,091	0,021	0,258	0,191	0,060	0,068	0,252	0,770
88	0,371	0,486	0,030	0,472	0,230	4,464	0,056	0,064	0,086	0,018	0,243	0,178	0,048	0,070	0,270	0,653
104	0,373	0,442	0,012	0,430	0,222	4,271	0,060	0,065	0,089	0,020	0,235	0,186	0,035	0,080	0,260	1,000

**Tabela B.13 – Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Totais (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Viáveis (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>pH</b>
0	0,253	0,224	88,64	7,40
8	0,270	0,239	88,66	7,33
16	0,324	0,284	87,67	7,28
24	0,401	0,356	88,77	7,17
32	0,715	0,636	88,99	7,39
43	0,942	0,812	86,20	7,30
52,5	1,146	0,941	82,11	7,00
67	1,663	1,214	73,02	7,19
75	1,758	1,109	63,10	7,10
92	1,712	0,739	43,19	7,27
99,5	1,885	0,484	25,66	7,15

**Tabela B.14 – Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (mM)</b>	<b>Glutamina (mM)</b>	<b>Lactato (mM)</b>	<b>Íon Amônio (mM)</b>	<b>Ácido Glutâmico (mM)</b>
0	29,44	5,60	2,86	7,53	0,198
8	28,99	4,90	4,75	7,74	0,247
16	28,09	4,11	7,04	7,82	0,286
24	27,07	3,53	9,66	7,91	0,337
32	25,43	3,28	13,35	8,24	0,417
43	23,02	2,61	18,97	8,62	0,572
52,5	20,96	1,65	22,80	9,08	0,793
67	19,44	0,45	25,42	10,39	1,390
75	18,93	0,15	26,11	11,24	1,472
92	18,56	0	26,79	11,32	1,479
99,5	18,79	0	27,24	11,32	1,391

**Tabela B.15 – Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-a realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Asp (Mm)</b>	<b>Ser (mM)</b>	<b>His (mM)</b>	<b>Arg (mM)</b>	<b>Thr (mM)</b>	<b>Ala (mM)</b>	<b>Tyr (mM)</b>	<b>Val (mM)</b>	<b>Met (mM)</b>	<b>Cys (2) (mM)</b>	<b>Ile (mM)</b>	<b>Leu (mM)</b>	<b>Phe (Mm)</b>	<b>Lys (mM)</b>	<b>Gly (mM)</b>	<b>Trp (mM)</b>
0	0,355	0,285	0,030	0,432	0,243	0,615	0,030	0,157	0,321	0,075	0,502	0,449	0,147	0,228	0,355	0,812
8	0,373	0,299	0,030	0,429	0,187	1,052	0,035	0,151	0,301	0,072	0,469	0,425	0,160	0,225	0,366	0,770
16	0,366	0,347	0,037	0,434	0,233	1,440	0,033	0,146	0,280	0,066	0,439	0,395	0,158	0,227	0,333	0,705
24	0,374	0,369	0,032	0,418	0,213	1,797	0,035	0,138	0,254	0,064	0,421	0,376	0,162	0,210	0,325	0,884
32	0,378	0,421	0,034	0,430	0,220	2,392	0,040	0,132	0,231	0,060	0,401	0,353	0,162	0,209	0,326	0,786
43	0,343	0,485	0,028	0,411	0,218	3,134	0,042	0,130	0,220	0,044	0,385	0,324	0,160	0,180	0,337	0,938
52,5	0,320	0,575	0,034	0,422	0,223	3,338	0,043	0,094	0,124	0,034	0,278	0,223	0,109	0,156	0,340	0,745
67	0,387	0,800	0,040	0,451	0,209	4,227	0,055	0,100	0,123	0,029	0,248	0,181	0,085	0,150	0,279	0,742
75	0,387	0,854	0,042	0,449	0,225	4,321	0,056	0,089	0,086	0,009	0,212	0,144	0,076	0,138	0,293	0,809
92	0,398	0,955	0,042	0,468	0,189	4,529	0,057	0,103	0,118	0	0,203	0,132	0,078	0,142	0,394	0,745
99,5	0,318	0,900	0,041	0,435	0,207	4,330	0,054	0,080	0,101	0	0,162	0,115	0,075	0,145	0,386	0,749

**Tabela B.16 – Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Totais (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Viáveis (10<sup>6</sup>.cell.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>pH</b>
0	0,159	0,139	87,06	7,30
15	0,251	0,228	91,02	7,29
27	0,347	0,316	91,17	7,24
39	0,634	0,589	92,91	7,37
51	0,828	0,739	89,27	7,17
63	1,176	0,965	82,08	7,06
75	1,399	1,022	73,06	7,05
87	1,575	0,978	62,10	7,15
99	1,868	0,878	46,97	7,17
111	1,549	0,424	27,39	7,27

**Tabela B.17 – Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-b realizado com o hibridoma NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (mM)</b>	<b>Glutamina (mM)</b>	<b>Lactato (mM)</b>	<b>Íon Amônio (mM)</b>	<b>Ácido Glutâmico (mM)</b>
0	28,92	5,780	2,44	7,05	0,218
15	28,35	4,830	5,28	7,18	0,297
27	27,03	4,201	8,48	7,18	0,353
39	24,77	3,758	13,44	7,32	0,435
51	22,34	2,966	19,68	7,73	0,553
63	19,65	1,790	25,06	8,81	0,729
75	18,24	0,925	27,86	9,86	1,338
87	17,33	0	29,21	10,80	1,520
99	16,89	0	29,94	11,33	1,478
111	16,88	0	30,40	11,66	1,470

**Tabela B.18 – Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento V-NAKA-10%-b realizado com o híbrido NAKA4-56A137**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Asp (Mm)</b>	<b>Ser (mM)</b>	<b>His (mM)</b>	<b>Arg (mM)</b>	<b>Thr (mM)</b>	<b>Ala (mM)</b>	<b>Pro (mM)</b>	<b>Tyr (mM)</b>	<b>Val (mM)</b>	<b>Met (mM)</b>	<b>Cys (2) (Mm)</b>	<b>Ile (mM)</b>	<b>Leu (mM)</b>	<b>Phe (Mm)</b>	<b>Lys (mM)</b>	<b>Gly (mM)</b>	<b>Trp (mM)</b>
0	0,412	0,336	0,503	0,494	0,287	0,484	0,335	0,036	0,199	0,387	0,074	0,569	0,517	0,194	0,269	0,448	0,441
15	0,430	0,343	0,036	0,472	0,262	1,224	0,242	0,027	0,161	0,316	0,070	0,497	0,449	0,195	0,252	0,469	0,611
27	0,423	0,388	0,037	0,481	0,218	1,817	0,211	0,030	0,156	0,296	0,062	0,446	0,395	0,145	0,236	0,483	0,605
39	0,398	0,421	0,033	0,481	0,197	2,372	0,210	0,035	0,140	0,250	0,042	0,401	0,339	0,123	0,216	0,410	0,649
51	0,359	0,461	0,033	0,435	0,185	2,964	0,168	0,038	0,127	0,209	0,023	0,318	0,260	0,100	0,174	0,378	0,461
63	0,323	0,505	0,031	0,390	0,180	3,118	0,171	0,036	0,096	0,144	0,008	0,256	0,197	0,088	0,144	0,330	0,430
75	0,387	0,759	0,043	0,504	0,195	4,373	0,292	0,054	0,113	0,149	0	0,262	0,185	0,087	0,156	0,312	0,467
87	0,370	0,807	0,038	0,493	0,205	4,493	0,336	0,053	0,102	0,128	0	0,184	0,118	0,078	0,132	0,304	0,495
99	0,342	0,819	0,030	0,482	0,180	4,559	0,318	0,050	0,090	0,085	0	0,136	0,094	0,078	0,142	0,388	0,475
111	0,363	0,835	0,038	0,470	0,277	4,690	0,337	0,065	0,117	0,133	0	0,143	0,091	0,078	0,142	0,432	0,481

**Tabela B.19 – Valores de concentração de células totais, células viáveis, viabilidade e pH obtidos durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18**

Tempo (h)	Células Totais ( $10^6 \cdot \text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Células Viáveis ( $10^6 \cdot \text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Viabilidade (%)	pH
0	0,217	0,191	90,79	7,30
9	0,225	0,193	85,53	7,44
20	0,304	0,264	86,65	7,39
28	0,349	0,307	87,99	7,20
36	0,426	0,365	85,76	7,21
44	0,530	0,456	86,08	7,10
52	0,714	0,617	86,35	7,07
60	0,783	0,666	85,48	7,13
68	0,951	0,822	86,46	7,00
76	1,104	0,906	82,05	6,98
84	1,216	0,891	73,26	6,91
92	1,284	0,791	61,64	7,02
101	1,363	0,679	49,86	6,80

**Tabela B.20 – Valores de concentração de glicose, glutamina, lactato, íon amônio e ácido glutâmico obtidos durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o hibridoma TAN1-112A18**

Tempo (h)	Glicose (mM)	Glutamina (mM)	Lactato (mM)	Íon Amônio (mM)	Ácido Glutâmico (mM)
0	30,20	5,70	2,72	3,66	0,14
9	28,70	5,45	4,65	3,80	0,22
20	27,60	4,95	6,87	4,05	0,42
28	26,30	4,48	8,38	4,20	0,53
36	25,00	4,11	10,69	4,46	0,65
44	23,20	3,98	12,81	4,85	0,69
52	21,00	3,65	14,90	5,19	0,80
60	19,00	3,32	16,84	5,50	0,97
68	17,70	2,71	18,64	5,78	1,00
76	15,90	2,07	19,74	6,20	1,10
84	14,70	1,56	21,10	6,55	1,27
92	13,00	1,04	22,00	6,90	1,32
101	12,00	0,71	23,15	7,31	1,53

**Tabela B.21 – Valores de concentração de aminoácidos obtidos durante o cultivo no Experimento VI-TAN-10% realizado com o híbrido TAN1-112A18**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Asp (Mm)</b>	<b>Ser (mM)</b>	<b>His (mM)</b>	<b>Arg (mM)</b>	<b>Thr (mM)</b>	<b>Ala (mM)</b>	<b>Pro (mM)</b>	<b>Tyr (mM)</b>	<b>Val (mM)</b>	<b>Met (mM)</b>	<b>Cys (2) (Mm)</b>	<b>Ile (mM)</b>	<b>Leu (mM)</b>	<b>Phe (Mm)</b>	<b>Lys (mM)</b>	<b>Gly (mM)</b>	<b>Trp (mM)</b>
0	0,130	0,265	0,026	0,376	0,452	0,365	0,210	0,017	0,133	0,267	0,050	0,396	0,421	0,158	0,246	0,624	0,449
9	0,120	0,305	0,033	0,435	0,446	0,909	0,205	0,023	0,138	0,274	0,056	0,403	0,429	0,163	0,272	0,844	0,425
20	0,135	0,316	0,033	0,415	0,464	1,653	0,208	0,031	0,141	0,275	0,057	0,397	0,429	0,165	0,286	0,877	0,472
28	0,140	0,320	0,033	0,410	0,440	2,010	0,230	0,045	0,146	0,276	0,055	0,393	0,423	0,163	0,282	0,987	0,413
36	0,156	0,326	0,108	0,410	0,428	2,264	0,147	0,046	0,137	0,260	0,053	0,371	0,395	0,135	0,326	0,865	0,362
44	0,160	0,378	0,033	0,565	0,283	3,454	0,198	0,068	0,164	0,353	0,062	0,553	0,519	0,217	0,337	0,870	0,537
52	0,160	0,378	0,033	0,556	0,273	3,661	0,221	0,070	0,145	0,276	0,057	0,488	0,449	0,157	0,300	0,846	0,494
60	0,170	0,416	0,041	0,576	0,351	4,002	0,242	0,087	0,143	0,263	0,045	0,465	0,424	0,132	0,286	0,824	0,374
68	0,180	0,421	0,034	0,562	0,323	4,109	0,244	0,084	0,129	0,235	0,040	0,435	0,390	0,119	0,282	0,663	0,500
76	0,190	0,454	0,036	0,545	0,329	4,229	0,247	0,095	0,120	0,210	0,035	0,411	0,358	0,104	0,254	0,556	0,441
84	0,200	0,513	0,037	0,554	0,381	4,564	0,268	0,106	0,116	0,202	0,029	0,417	0,359	0,104	0,259	0,491	0,447
92	0,200	0,506	0,048	0,503	0,298	4,413	0,272	0,104	0,106	0,179	0,027	0,390	0,331	0,089	0,229	0,412	0,426
101	0,220	0,561	0,051	0,500	0,292	4,730	0,316	0,114	0,108	0,179	0,025	0,404	0,339	0,089	0,240	0,424	0,470