

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

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS E
METABÓLICAS DE DOIS HIBRIDOMAS PARA
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
PARA TIPAGEM SANGUÍNEA**

Bruna Gabriela Silva

São Carlos – SP
2012

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

**Avaliação de características cinéticas e metabólicas de dois
hibridomas para produção de anticorpos monoclonais
para tipagem sanguínea**

Bruna Gabriela Silva

**Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Química, Área
de Concentração em Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos Químicos
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alberto
Torres Suazo**

**São Carlos – SP
2012**

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

S586ac

Silva, Bruna Gabriela.

Avaliação de características cinéticas e metabólicas de dois hibridomas para produção de anticorpos monoclonais para tipagem sanguínea / Bruna Gabriela Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

84 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Anticorpos monoclonais. 3. Hibridoma. 4. Tipagem sanguínea. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **BRUNA GABRIELA SILVA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 23 DE MARÇO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:



Cláudio Alberto Torres Suazo
Orientador / PPGEQ-UFSCar



Elisabeth de Fátima Pires Augusto
IPT



Rosana Rossi Ferreira
UNESP



Teresa Cristina Zangirolami
UFSCar



Kamilla Swiech Antonietto
USP

Dedico este trabalho à minha família e amigos.

“O sucesso é uma consequência e não um objetivo.”
(Gustave Flaubert)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo, pela orientação, pela amizade e pela compreensão por ter aceitado as mudanças ao decorrer do projeto.

Ao pessoal do Latecc, pela ajuda e cooperação principalmente nos últimos meses de experimentos e análises.

Ao Henrique pela maravilhosa ajuda no laboratório salvando minha pele em muitas situações e também pela super amizade em todos os momentos, me apoiando, me consolando e me aconselhando...

Ao Lucas, meu namorado, pelo carinho e compreensão pelos finais de semana passados no laboratório e pela companhia para tirar os pontos a noite. E também pelo incentivo que faltava quando passei pela fase mais difícil.

Aos meus pais, Lena e Paulo, pelo apoio, incentivo e paciência pelos finais de semana que deixamos de estar juntos. À minha irmã, Bárbara pela cooperação e ajuda, principalmente na época da defesa.

Aos meus colegas de trabalho no Metrô, e ao meu chefe pelos conselhos e apoio para que tudo desse certo e eu não desistisse apesar do cansaço pelas viagens. E também por me ajudarem muito na etapa final quando precisei de folgas e férias para terminar os experimentos.

A Deus por todas as graças em minha vida.

Agradeço também a todos que de alguma maneira me ajudaram de alguma forma neste trabalho.

À CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

A produção em larga escala de anticorpos monoclonais é o campo da Biotecnologia que tem conseguido os maiores avanços e realizações ao longo dos últimos 20 anos, especialmente na área de diagnóstico e de aplicações terapêuticas. O mercado mundial de produtos para diagnóstico clínico atingiu o valor de US\$ 19,0 bilhões em 2008 e continua crescendo a um ritmo de 5% ao ano. O desenvolvimento de bioprocessos de alta produtividade em larga escala para produção de anticorpos monoclonais (AMs) depende da determinação e otimização de vários parâmetros cinéticos e metabólicos dos hibridomas. A finalidade deste trabalho foi analisar características cinéticas e metabólicas de hibridomas murinos para produção de imunoglobulinas para tipagem sanguínea pelo sistema ABO, de grande interesse para a saúde pública Brasileira. Três linhagens de hibridomas murinos denominadas ED7, ED9 e TAN obtidas num centro de pesquisa brasileiro para produzir os anticorpos anti-A, anti-B e anti-AB, respectivamente, foram avaliados com essa finalidade. Utilizando apenas as duas linhagens, ED7 e ED9, por apresentarem maior potencial e estabilidade para produção de AMs em larga escala foram realizados experimentos de cultivo em batelada em frasco spinner de 500 mL e em biorreator (Bioflo-110) de 2L, utilizando meios de cultura RPMI 1640 e Mab Quantum Yield-BD, ambos com adição de 10% v/v de soro fetal bovino. O primeiro sendo meio de origem dos clones híbridos, em alguns casos teve que ser suplementado com aminoácidos (Gln, Met, Cys, Ser, Lys e Pro) e, o segundo, um meio alternativo ao qual tiveram que ser adaptados os hibridomas sem suplementos antes dos experimentos de cultivo em regime de batelada. Os resultados mostraram a necessidade de balanceamento nutricional adicional dos meios, especialmente do RPMIS, para satisfazer as demandas nutricionais dos dois hibridomas. Mediante balanceamento nutricional e cultivos em condições melhor controladas em biorreator conseguiu-se incrementar a taxa específica máxima de crescimento μ_{\max} de $0,0304 \pm 0,0014 \text{ h}^{-1}$ para $0,0329 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ e a produtividade de AM de $0,031 \text{ mg/L.h}$ para $0,077 \text{ mg/L.h}$ com a linhagem ED7. Com a linhagem ED9, o μ_{\max} diminuiu de $0,0412 \pm 0,0024 \text{ h}^{-1}$ para $0,0373 \pm 0,0019 \text{ h}^{-1}$ mas a produtividade de AM aumentou de $0,030 \text{ mg/L.h}$ para $0,040 \text{ mg/L.h}$. Por outro lado, testes de aglutinação mostraram que os AMs estavam funcionais e com títulos estáveis e dentro dos limites aceitáveis. Apesar dos ganhos em produtividade dos dois AMs, os resultados permitiram constatar um problema típico encontrado no cultivo *in vitro* de hibridomas que se caracteriza por desregulação de seu metabolismo na presença de altas concentrações de glicose e glutamina, o que provoca produção exacerbada dos metabólitos lactato e amônia. Em função disto, pode-se prever que o futuro do desenvolvimento do bioprocessos de produção de anti-A e anti-AB tenha que passar por uma etapa de avaliação e otimização em sistema de cultivo de batelada alimentada.

ABSTRACT

The large scale production of monoclonal antibodies is the Biotechnology field that has achieved the biggest advances and realizations over the last 20 years, especially in the area of diagnosis and therapeutic applications. The world market of products for clinical diagnosis reached the value of US\$ 19.0 billions in 2008 and continues to grow at a rate of 5 % per year. The development of bioprocesses of high productivity in large scale production of monoclonal antibodies (MABs) depends on the determination and optimization of various kinetic and metabolic parameters of hybridomas. The aim of this study was to analyze kinetic and metabolic characteristics of murine hybridomas for production of immunoglobulins for blood typing by the ABO system, of great interest to the Brazilian public health. Three strains of murine hybridomas named ED7, ED9 and TAN generated in a Brazilian research center to produce the antibodies anti-A, anti-B and anti-A,B, respectively, were evaluated for this purpose. Using only two lineages, ED7 and ED9, because of presenting bigger potential and stability for production of AMs in large scale, experiments of cultivation were carried out in spinner flask of 500 mL and in bioreactor (Bioflo-110) of 2L, using culture media RPMI 1640 and MAb Quantum Yield-BD, both with addition of 10 % v/v of fetal bovine serum. The first one being the medium of origin of the hybrid clones, in some cases supplemented with amino acids (Gln, Met, Cys, Ser, Lys and Pro), and the second, a new alternative medium to which the hybridomas had to be adapted before the cultivation experiments. The results showed the need for additional nutritional balance of the media, especially RPMIS, to meet the nutritional demands of the two hybridomas. Through nutritional balance and cultivation in better controlled conditions in the bioreactor, it was possible to raise the maximum specific growth rate μ_{max} from $0.0304 \pm 0.0014 \text{ h}^{-1}$ to $0.0329 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ and the productivity of AM from 0.031 mg/L.h to 0.077 mg/L.h with the lineage ED7. With the lineage ED9 the μ_{max} decreased from $0.0412 \pm 0.0024 \text{ h}^{-1}$ to $0.0373 \pm \text{h}^{-1}$ but increased the productivity of AM from 0.030 mg / L.h to 0.040 mg / L.h . On the other hand, agglutination tests showed that the antibodies were functional and with titles stable and within normal limits. Despite the gains in productivity of the two AMs, the results highlighted a typical problem found *in vitro* cultivation of hybridomas, which is characterized by deregulation of its metabolism in the presence of high concentrations of glucose and glutamine, conducing to overproduction of the metabolites lactate and ammonia. Because of this, one can predict that the future development of the bioprocess for the production of anti-A and anti-AB has to go through a stage of evaluation and system optimization in fed batch cultivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura básica de uma Imunoglobulina.....	9
Figura 3.2: Esquema ilustrativo das etapas seguidas para obtenção de hibridomas.....	12
Figura 3.3: Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.	14
Figura 3.4: Visão geral dos principais metabolismos energéticos em uma célula animal. Adaptado de Altamirano e colaboradores (2000).....	16
Figura 3.5: Exemplos de biorreatores homogêneos.....	31
Figura 4.1: Representação esquemática dos procedimentos de cultivo dos hibridomas murinos para experimentos em Spinner e Biorreator (Bioflo 110).	44
Figura 5.1: Resultados de crescimento celular e aminoácidos mais consumidos e produzidos do experimento realizado em spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm. Adaptado de Ferreira, 2007.....	49
Figura 5.2: Comportamento do hibridoma ED7 ao ser adaptado a concentrações crescentes do meio de cultura MQYS.....	50
Figura 5.3: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais consumidos e produzidos, pH e concentração de anticorpo monoclonal dos experimentos realizados em spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm. A) ES2 com meio de cultura RPMIS suplementado com 3,525 mg/L de Ser, 2,255 mg/L de Met, 7,7 mg/L de Cys, 3,812 mg/L de Lys e 15 mg/L de Gln e B) ES3 com meio de cultura MQYS.	51
Figura 5.4: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais produzidos e consumidos, concentração de anticorpo monoclonal obtidos no EB4, cultivo em biorreator de 2L com volume de trabalho de 650 ml, a 37°C, agitação de 100 rpm, meio controlado em pH 7,2, com meio RPMIS, suplementado com 3,525 mg/L de Ser, 2,255 mg/L de Met, 7,7 mg/L de Cys, 3,812 mg/L de Lys e 15 mg/L de Gln. O oxigênio dissolvido foi controlado em 40% da saturação com ar	53
Figura 5.5: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais consumidos e produzidos em ES5, realizado em spinner de 500ml com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm e meio de cultura RPMIS	55
Figura 5.6: Comportamento do hibridoma ED9 ao ser adaptado a concentrações crescentes do meio de cultura MQYS.....	56
Figura 5.7: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais consumidos e produzidos e concentração de anticorpo monoclonal dos experimentos feitos em spinner de 500ml com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm. A) ES6 com meio de cultura RPMIS suplementado com 2,575 mg/L de Pro, 7,7 mg/L de Cys e 15 mg/L de Gln e B) ES7 com meio de cultura MQYS.....	57

Figura 5.8: Resultados de crescimento celular, glicose e aminoácidos mais consumidos e produzidos e concentração de anticorpo monoclonal anti-AB no experimento EB8, cultivo em biorreator de 2L com volume de trabalho de 650 ml, a 37°C, agitação de 80 rpm, meio MQYS, controlado em pH 7,2 e oxigênio dissolvido controlado em 40% da saturação com ar60

Figura 5.9: Resultados de concentração celular total e viável e viabilidade para a ativação após descongelamento da linhagem TAN em meio de cultura RPMI com adição de 20% de SFB em cultura em frasco T.62

Figura 5.10: Resultados de produção de anticorpos monoclonais produzidos nos 6 experimentos de cultivo realizados neste trabalho com os meios de cultivo suplementados RPMIS e MQYS. A) AM anti-A produzido pelo hibridoma ED7 e B) AM anti-AB produzido pelo hibridoma ED9.63

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Marcos na produção industrial de produtos farmacêuticos (Kretzmer, 2002)	8
Tabela 3.2: Isótipos de anticorpos dos mamíferos.	10
Tabela 3.3: Valores de velocidade específica de respiração celular para diversas linhagens celulares (Ruffieux et al, 1998).	22
Tabela 3.4: Classificação dos biorreatores segundo a homogeneidade do sistema.	29
Tabela 3.5: Cultivos de hibridomas em batelada e batelada alimentada.	33
Tabela 4.1: Composição básica do meio de cultura utilizado nos cultivos dos hibridomas. ...	39
Tabela 5.1: Programação geral dos experimentos de cultivo.	48
Tabela 5.2: Valores de $\mu_{\text{máx}}$, concentração máxima de células viáveis e produtividade encontrados nos experimentos ES2, ES3 e EB4.	54
Tabela 5.3: Valores de $\mu_{\text{máx}}$, concentração máxima de células viáveis e produtividade encontrados nos experimentos ES6, ES7 e EB8.	61

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
SUMÁRIO.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 CÉLULAS ANIMAIS	5
3.1.1 HISTÓRIA	5
3.1.2 PRODUÇÃO INDUSTRIAL	6
3.1.3 IMUNOGLOBULINAS E ANTICORPOS MONOCLONAIS	8
3.2 CRESCIMENTO CELULAR.....	14
3.3 METABOLISMO DE CÉLULAS EM CULTURA.....	16
3.3.1 GLICOSE	17
3.3.2 GLUTAMINA	18
3.3.3 OUTROS AMINOÁCIDOS.....	20
3.3.4 OXIGÊNIO.....	21
3.3.5 SUBPRODUTOS	22
3.3.6 INFLUÊNCIA DO PH	24
3.3.6 REDUÇÃO DE METABÓLITOS TÓXICOS	25
3.4 MEIOS DE CULTURA	25
3.4.1 O USO DE SORO	26
3.5 BIORREATORES PARA CULTIVO DE CÉLULA ANIMAL.....	28
3.5.1 TIPOS DE BIORREATORES	28
3.5.2 MODOS DE OPERAÇÃO.....	32
3.5.3 AERAÇÃO E AGITAÇÃO.....	34
3.6 COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 MATERIAL	37
4.1.1 Células de hibridomas	37

4.1.2 Meio de Cultura	39
4.1.3 Corantes	40
4.1.4 Reagentes para ELISA	40
4.2 EQUIPAMENTOS	41
4.2.1 Câmara asséptica	41
4.2.2 Incubadora	41
4.2.3 Centrífuga	41
4.2.4 Microscópio	42
4.2.5 Sistema de filtração de meio de cultura.....	42
4.2.6 Frascos de cultura e vidrarias	42
4.2.7 Espectrofotômetro de multiplacas	42
4.3 MÉTODOS	42
4.3.1 Determinação da concentração e viabilidade celular	42
4.3.2 Análise de substratos, metabólitos e produto	43
4.3.3 Procedimento experimental utilizado nos experimentos	44
4.3.4 Tratamento dos resultados	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 ESQUEMA EXPERIMENTAL GERAL DA PESQUISA.....	47
5.2 Cultivo em batelada da linhagem ED7 em frasco spinner.....	48
5.3 Cultivo em batelada da linhagem ED7 em biorreator	53
5.4 Cultivo em batelada da linhagem ED9 em frasco spinner.....	55
5.5 Cultivo em batelada da linhagem ED9 em biorreator	58
5.6 Testes de hemaglutinação	61
5.7 Cultivo em batelada da linhagem TAN em spinner	62
5.8 Sobre a produção de anticorpos monoclonais pelos hibridomas.....	63
5.9 Análise geral dos resultados deste trabalho	64
6 CONCLUSÕES	65
7 RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO A	77

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas os anticorpos monoclonais (AMs), devido a sua alta seletividade, têm sido uma ferramenta valiosa como reagentes para tratamento de doenças infecciosas e câncer, identificação de doenças, assim como para diagnóstico em pesquisa biomédica (Adams e Weiner, 2005; Ozturk e Wu, 2006, Saleem e Kamal, 2008) e tipagem sanguínea ABO (Kretzmer, 2002). O mercado mundial de produtos para diagnóstico clínico atingiu o valor de US\$ 19,0 bilhões e continua crescendo a um ritmo de 5% ao ano (Saleem e Kamal, 2008). Embora a maioria dos AMs seja produzida na atualidade por células CHO recombinantes, a utilização de hibridomas murinos ainda oferece condições de competir por uma boa parte desse mercado, otimismo que se renova a partir dos avanços conseguidos em áreas como automação, microarray e nanotecnologias (Chiarella e Fazio, 2008).

O diagnóstico da compatibilidade sanguínea através do uso do sistema ABO é de grande importância na medicina moderna, pois transfusões ou transplantes que não envolvem compatibilidade sanguínea podem culminar em risco à vida do paciente. O teste baseia-se na utilização de anticorpos anti-A e anti-B que aglutinam especificamente as hemácias que possuem os antígenos A e B correspondentes. São considerados 4 grupos sanguíneos neste sistema: Anti-A, anti-B, anti-A,B e anti-O. Desta forma, o sistema ABO pode ser considerado na atualidade o sistema de classificação de grupos sanguíneos humanos mais importante do ponto de vista clínico. Na década dos 1980s a eficiência e credibilidade do sistema ABO foi reforçada com o advento da tecnologia de fusão de células de linfócitos com células de mieloma, hoje mais conhecida como tecnologia de hibridomas. Descoberta uma década antes por Köhler e Milstein (1975) esta tecnologia possibilitou a produção em larga escala de anticorpos monoclonais através de cultivo de células em biorreatores (Lebherz et al., 1985; Arathoon e Birch, 1986; Birch et al. 1987).

A produção em larga escala de anticorpos monoclonais é um dos poucos campos da Biotecnologia que tem conseguido grandes avanços e padronização ao longo dos últimos 20 anos (Birch e Racher, 2006; Jain e Kumar, 2008; Feng et al., 2010; Shukla e Thommes, 2010; Chon e Papastoitsis, 2011). As melhoras mais importantes incluem melhores linhagens, meios de cultura de alto desempenho, processos de cultivo otimizados, melhores biorreatores e processos de purificação. O resultado dessas melhoras se refletiu num substancial aumento da produtividade do processo e, conseqüentemente, na redução do custo

por grama dos AMs. A tecnologia utilizada no processo de cultivo e na separação e purificação de um AM exige um alto grau de sofisticação, fazendo com que o produto final atinja valor de venda da ordem de US\$ 80-3000 por grama de AM (Doran, 1995). Neste contexto, torna-se imprescindível a procura de processos de cultivo de hibridomas e de purificação de alta eficiência para minimizar os custos de produção dos AMs.

A produção de AMs em escala industrial é feita em biorreatores em condições rigorosamente controladas e monitoradas (Jain e Kumar, 2008). O biorreator preferido para produção de AMs terapêuticos em escala laboratorial e industrial com células em suspensão são os biorreatores de tanque agitado (Wurm, 2004; Ozturk e Wu, 2006, Rodrigues et al., 2010). A versão industrial consiste num tanque de aço inoxidável munido de agitadores mecânicos e de controladores automáticos de temperatura, pH e de oxigenação (Chu e Robinson, 2001; Ozturk e Wu, 2006; Mel et al., 2008). A versão laboratorial, conhecida como biorreator de vidro, bem mais simples, de menor tamanho, consiste de frasco cilíndrico de vidro com agitador de Teflon[®] ou vidro acionado magneticamente. O frasco é operado a temperatura e pH razoavelmente constantes no interior de uma incubadora de CO₂. A etapa de purificação dos AMs, também conhecida como “downstream processing” tradicionalmente envolve uma seqüência de varias etapas de filtração e cromatografia de coluna (Low et al. 2007). Atualmente, tanto a etapa de biorreator como a de purificação estão passando por mudanças inovadoras com a introdução de tecnologias alternativas, especialmente de uso único (single use) com o propósito de aumentar a flexibilidade e rapidez ao mesmo tempo que se reduz custos e tempos mortos (Shukla e Thommes, 2010; Chon e Papastoitsis, 2011).

Na América do sul, especificamente no Brasil, embora existam centros de pesquisa e desenvolvimento assim como especialistas capacitados para gerar linhagens de hibridomas produtoras de AMs, há muita carência no que se refere a “know how” para implementação da tecnologia de produção em larga escala. Um desses centros que conta com uma equipe qualificada para obtenção de hibridomas é o grupo do Laboratório de Engenharia de Tecidos da UNESP, no hemocentro do Hospital das Clínicas em Botucatu-SP. O consumo de anticorpos monoclonais na região envolve um mercado cuja demanda é suprida exclusivamente através de importação, situação que torna os preços dos AMs ainda menos acessíveis devido a taxa de alfândega. A instalação de uma unidade industrial produtora de vários AMs em larga escala na região representaria uma grande economia para os órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública.

O desenvolvimento de um processo de produção em larga escala de anticorpos monoclonais é complexo e oneroso. Uma vez obtida uma linhagem estável e produtora do anticorpo de interesse, a formulação de um meio de cultura adequado passa a ser um dos fatores prioritários. Sua função é proporcionar pH e osmolalidade apropriados para a sobrevivência e multiplicação da célula e também fornecer todas as substâncias químicas requeridas pela célula, as quais esta não é capaz de sintetizar (Moraes et al., 2007). Informações sobre o metabolismo de hibridomas são fundamentais para a formulação de novos meios de cultivo, assim como para definição da melhor estratégia de alimentação de nutrientes (batelada, batelada alimentada e contínua) e de procedimentos para a purificação do AM de interesse (Burgener e Butler, 2006).

Cultivar células de mamíferos em biorreatores leva a um metabolismo diferenciado devido à altas taxas de glicólise e glutaminólise (Zhou, 1995). Amônia e lactato são os principais produtos do metabolismo da glutamina e glicose, e já foi demonstrado que seu acúmulo diminui o crescimento e afeta o metabolismo e produção de AM em células de hibridomas (Ozturk et al., 1992). Outra peculiaridade importante desses metabólitos é a influência que exercem na qualidade do produto, especialmente no que se refere à glicosilação de proteínas (Gawlitzeck et al., 1998).

Este trabalho foi concebido para contribuir com o desenvolvimento de uma plataforma tecnológica de produção em escala comercial de anticorpos monoclonais hemoclassificatórios anti-A e anti-AB utilizando linhagens de hibridomas produtoras obtidas num prestigiado centro de pesquisa brasileiro. Com essa finalidade foram realizados cultivos em duas fases, primeiro em frascos spinner de 500 mL para conhecer as características metabólicas chave dos clones selecionados em dois meios de cultivo e, segundo, em biorreator de tanque agitado em escala de bancada (2L), em condições bem mais emulativas da escala industrial para identificar e dimensionar parâmetros de cultivo importantes para o escalonamento. Os resultados deste estudo permitiram identificar condições de cultivo dos hibridomas que proporcionam altas produtividades dos AMs, dados valiosos para a realização posterior de avaliações técnico-econômicas do que poderá ser o bioprocessamento em escala industrial.

2 OBJETIVO

O presente trabalho visou o estudo de características metabólicas de três linhagens de hibridomas murinos e sua influência na cinética de crescimento celular e de produção dos respectivos anticorpos monoclonais anti-A, anti-B e anti-AB, visando a definição de estratégias para o melhoramento da produtividade dos processos de cultivo para produção desses anticorpos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÉLULAS ANIMAIS

3.1.1 HISTÓRIA

O termo cultura de células refere-se a cultivos derivados de células dispersas, obtidas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular. Fundamentalmente, as células podem se desenvolver *in vitro* após dissecação e dispersão total ou parcial do tecido de origem, resultando em culturas celulares propriamente ditas.

A prática de cultivar células começou desde o início do século XX com as primeiras tentativas de se manter pedaços de tecidos em plasma ou fluidos biológicos por vários dias ou semanas.

O ano de 1907 é comumente relacionado como o marco do início dos cultivos de células animais. Esse fato se deve a Ross Harrison (1907), o primeiro pesquisador a reportar a manutenção e crescimento de células nervosas em suspensão por um período superior a 30 dias, mostrando que as funções normais das células podiam ser mantidas *in vitro* (Kretzmer, 2002).

Durante as quatro décadas seguintes, o progresso da cultura celular foi limitado devido às dificuldades em se manter condições de esterilidade. Outro marco no cultivo de células veio com o desenvolvimento dos antibióticos no final de 1940, pois possibilitou a manutenção da esterilidade nos experimentos.

A principal descoberta em relação ao cultivo celular em larga escala pode ser atribuída a Eagle (1955), que realizou uma extensiva análise dos requerimentos nutricionais das células *in vitro* e desenvolveu um meio de cultura quimicamente definido – EMEM (*Eagle's minimum essential medium*) que pôde substituir os fluidos biológicos até então utilizados. Esta descoberta, juntamente com o desenvolvimento de linhagens de células permanentes, que podem ser sub-cultivadas indefinidamente, e que possuem a capacidade de crescer em suspensão, exerceu um grande impacto no cultivo em larga escala de células animais (Kretzmer, 2002).

3.1.2 PRODUÇÃO INDUSTRIAL

O primeiro processo industrial de cultivo de células animais foi realizado há aproximadamente 50 décadas com a produção da vacina contra poliomielite (Salk) em células primárias de rim de macaco (Griffiths 2000). O processo era feito em múltiplas unidades uma vez que essas células eram dependentes de ancoramento.

Em 1962, Capstick e colaboradores conseguiram cultivar células BHK (células renais de hamster) em suspensão. Esse sucesso, juntamente com o estabelecimento de linhagens permanentes, significou o avanço para o uso industrial de células animais e o desenvolvimento de processos em larga escala. Mas devido às necessidades de segurança, essas linhagens foram utilizadas apenas como vacina veterinária por um longo período. A vacina era contra febre aftosa em células BHK em suspensão (Finter et al, 1987) em biorreator agitado de 1000 L.

A substituição das células de rim de macaco por células mais seguras, como por exemplo, WI-38 (pulmão de feto humano) e MRC-5 (pulmão de feto humano) aumentou a produção de vacinas para uso humano: sarampo (1963), raiva (1964), caxumba (1969) e rubéola (1969). Todos estes processos eram realizados em batelada, onde as células cresciam até altas densidades para então serem infectadas com determinado vírus (Kretzmer, 2002).

Em meados de 1970, surgiu a segunda categoria de produtos industrialmente relevantes, quando Köhler e Milstein (1975) obtiveram sucesso na fusão de linfócitos com células de mieloma, originando os hibridomas. Esta técnica possibilitou às companhias farmacêuticas produzir anticorpos monoclonais (AMs) contra todos os antígenos conhecidos, através da fusão de linfócitos produtores de anticorpos com células originárias de tumor – mielomas. A expressão de anticorpos monoclonais em hibridomas resultou em um significativo aumento na produção de testes para diagnósticos médicos. A alta seletividade dos AMs permite uma vasta aplicação, como por exemplo, a identificação de vírus, bactérias ou parasitas, aumento do nível de determinadas enzimas (doenças coronárias) e reagentes para tipagem sanguínea ABO.

A expectativa inicial que estes anticorpos poderiam ser utilizados para terapia em humanos causou desapontamentos devido à severa imunogenicidade dos anticorpos murinos. Quando injetados em pacientes humanos, eventualmente geram uma resposta imune contra as proteínas estranhas, conhecida como resposta HAMA. Essa resposta contra os

anticorpos ministrados pode culminar em sua neutralização ou uma forte reação imune (Pucca et al, 2011).

Outro problema é a grande quantidade de anticorpos necessária para fins terapêuticos e a falta de processos econômicos de produção em larga-escala. No entanto, as pesquisas nesta área têm avançado de maneira rápida, e em alguns casos, os problemas relativos à sua utilização foram solucionados com a substituição de partes dos anticorpos murinos por partes humanas. Dependendo do modo como esses anticorpos são alterados, eles podem ser chamados de anticorpos monoclonais quiméricos ou anticorpos humanizados. Atualmente, tecnologias como Phage Display permitem a produção de anticorpos totalmente humanos (Ballow, 2005).

Em Junho de 2011, existiam 28 terapêuticos baseados em anticorpos monoclonais aprovados disponíveis no mercado, dos quais seis eram quiméricos, nove humanizados, nove totalmente humanos e quatro de origem murina (Elvin et al, 2012).

Exemplos de sucesso dessa estratégia podem ser dados por alguns produtos licenciados para terapia humana: 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 e Robinson, 2001; Kretzmer, et al., 2002). A maioria desses anticorpos são produzidos em culturas batelada ou batelada-alimentada em biorreatores de tanque agitado de 10.000 L ou mais (Birch e Racher, 2006).

Em 1980, um novo tipo de produto foi introduzido à indústria farmacêutica: proteínas recombinantes. A engenharia genética progrediu ao ponto da inserção estável de determinada parte de ADN em células de mamíferos ser possível. O primeiro produto não nativo (os produtos produzidos pela replicação viral e por hibridomas são considerados produtos nativos das células) produzido por células animais foi o tPA – *tissue plasminogen activator* – proteína necessária para dissolução de coágulos sanguíneos para o tratamento de problemas cardíacos. Os marcos na produção de produtos industrialmente relevantes estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Marcos na produção industrial de produtos farmacêuticos (Kretzmer, 2002)

Ano	Evento
1949	Produção do vírus da poliomielite em tecidos embrionários humanos
1954	Vacina Salk contra pólio em células primárias de rim de macaco foi licenciada para uso humano
1962	Vacina contra febre aftosa em células BHK para uso veterinário
1980	Interferon humano em células Namalwa
1986	Produção de anticorpos monoclonais para diagnóstico
1986	Produção de tPA em células CHO modificadas geneticamente

Com o crescente número de produtos derivados de culturas celulares, a necessidade de desenvolvimento e otimização dos processos de produção e separação/purificação é evidente. A transferência da escala laboratorial para escala industrial é ainda uma área desafiadora.

A importância do cultivo de células animais reflete-se no fato de que, entre os mais de 500 produtos biofarmacêuticos que se encontram atualmente em ensaios clínicos, cerca de metade é produzida por essa tecnologia. Dentre esses biofármacos encontramos proteínas recombinantes, produtos baseados em ácidos nucleicos e anticorpos monoclonais. Desde 1996, os AMs dominam a linha de produção de biofármacos.

Hoje em dia, o setor de anticorpos monoclonais alcança cerca de 7% do mercado de fármacos. Se levar em consideração a venda total de farmacêuticos, é uma porcentagem baixa, mas representa todo o crescimento do mercado nos últimos quatro anos (Pickering, 2011).

3.1.3 IMUNOGLOBULINAS E ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos são glicoproteínas solúveis sintetizadas e excretadas pelas células B quando estimuladas por antígenos (proteínas estranhas ao corpo), e que circulam livremente pelos fluidos biológicos do corpo. Pertencem a uma classe de proteínas conhecidas como gama globulinas, devido a sua estrutura globular. Outro nome comum para os anticorpos é imunoglobulina (Ig), que se refere à imunidade conferida pela fração de gamaglobulina (Benjamini et al., 2002).

Como pode ser visto na Figura 3.1, uma molécula de anticorpo possui uma estrutura básica simétrica composta de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Uma cadeia leve está ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte de dissulfeto, enquanto as duas cadeias pesadas estão ligadas entre si por pontes de dissulfeto (Abbas e Lichtman, 2005).

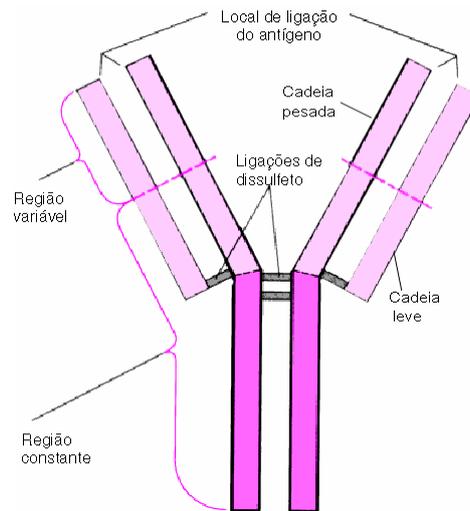


Figura 3.1: Estrutura básica de uma Imunoglobulina

Tanto as cadeias pesadas quanto as leves possuem uma região aminoterminal variável que participa no reconhecimento dos antígenos, e de regiões constantes carboxiterminais.

As regiões variáveis são assim denominadas porque contêm regiões em que a seqüência de aminoácidos é variável e distingue os anticorpos feitos por um clone de células B dos anticorpos feitos por outros clones (Abbas e Lichtman, 2005).

As duas características mais importantes na participação do anticorpo na resposta imune são a especificidade e atividade biológica.

A especificidade é conferida pela região variável. Esta característica permite que o anticorpo somente se ligue àquelas substâncias que contém uma estrutura antigênica particular.

Já a atividade biológica inclui efeitos como a neutralização de toxinas ou de vírus, a imobilização de microrganismos, a aglutinação de microrganismos ou de partículas antigênicas entre outros. Nem todos os anticorpos são iguais no seu desempenho de todas essas tarefas biológicas (Benjamini et al., 2002).

As diferenças nas várias atividades biológicas de anticorpos dependem das suas estruturas que definem os isótipos (classes). Cada isótipo pode combinar com o mesmo epítipo (região de ligação com o antígeno), mas cada um vai desencadear uma resposta diferente. Existem 5 classes de anticorpos denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A Tabela 3.2 resume suas principais funções.

Tabela 3.2: Isótipos de anticorpos dos mamíferos.

Nome	Tipos	Descrição	Complexos
IgA	2	Encontrado em áreas de mucosas, como os intestinos, trato respiratório e trato urogenital, prevenindo sua colonização por patógenos.	 <p>Monomer IgD, IgE, IgG</p> <p>Dimer IgA</p> <p>Pentamer IgM</p>
IgD	1	Funciona principalmente como um receptor de antígeno nas células B. Suas funções são menos definidas do que as dos outros isótipos.	
IgE	1	Se liga a alérgenos e desencadeia a liberação de histaminas dos mastócitos, também estando envolvido na alergia. Também protege contra vermes parasitas.	
IgG	4	em suas quatro formas, proporciona a principal imunidade baseada em anticorpos contra os patógenos que invadem o corpo. É o único tipo de Ig que o bebê recebe da mãe.	
IgM	1	Expressa na superfície das células B. Elimina patógenos nos estágios iniciais da imunidade mediada pelas células B antes que haja IgG suficiente.	

Fonte: wikipedia

A existência de uma vasta gama de epítipos potencialmente antigênicos tem tornado necessária a evolução de um sistema que produza um repertório de anticorpos em que cada um é capaz de ligar-se a uma estrutura antigênica particular. Portanto, a população total de anticorpos apresenta uma diversidade muito grande quanto aos tipos de estruturas moleculares com as quais conseguem reagir. Por outro lado, um anticorpo individual apresenta um alto grau de especificidade, uma vez que é capaz de reagir somente com uma determinada estrutura antigênica.

A descoberta dos mielomas, que consistem de células tumorais de linfócitos, contribuiu fortemente para o avanço nas pesquisas de determinação da estrutura e da funcionalidade dos anticorpos (Wu e Kabat, 1970). Os anticorpos recuperados de mielomas eram mais facilmente obtidos do que os de células normais. A descoberta do papel funcional das moléculas de anticorpos os tornaram moléculas de importante potencial terapêutico. No entanto, este potencial era limitado devido a impossibilidade de serem produzidos em larga

escala. Inicialmente, pensou-se na hipótese de usar mielomas para produzir anticorpos. No entanto, era preciso programar as células de mieloma a produzirem anticorpos com a especificidade de interesse. Este objetivo foi alcançado na década de 70, onde dois grandes pesquisadores, Kohler & Milstein (1975), desenvolveram uma metodologia que resultou em uma técnica de seleção de anticorpos com especificidade definida em forma clonal, chamados então de anticorpos monoclonais.

Anticorpos monoclonais (AMs) são anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B parental, sendo, portanto, idênticos em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas. Esses AMs podem ser gerados em laboratório para reconhecer e se ligar a qualquer antígeno de interesse. Tal procedimento foi descrito pela primeira vez em 1975, em artigo publicado na revista *Nature* pelos cientistas César Milstein e Georges Köhler. Por esse feito, ambos dividiram o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1984 com o dinamarquês Niels Kaj Jerne.

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.

Para produzir anticorpos monoclonais, linfócitos B são removidos do baço de algum animal, geralmente camundongo, no qual o antígeno do anticorpo desejado tenha sido previamente inoculado. Esses linfócitos são então fundidos com células de mieloma.

Depois de fundidos os hibridomas são isolados das células de mieloma por cultivo em meio de seleção HAT. E finalmente, a população de hibridomas selecionada vai passar por identificação e isolamento de clones que secretam um anticorpo que interage com o antígeno desejado. Isto geralmente é feito a partir da diluição da suspensão dos hibridomas em placas de cultura, tentando-se colocar 1 clone em cada poço. As células irão se multiplicar, obtendo-se então os clones que secretam determinado anticorpo monoclonal selecionados por técnicas imunoquímicas. A Figura 3.2 apresenta um esquema do procedimento.

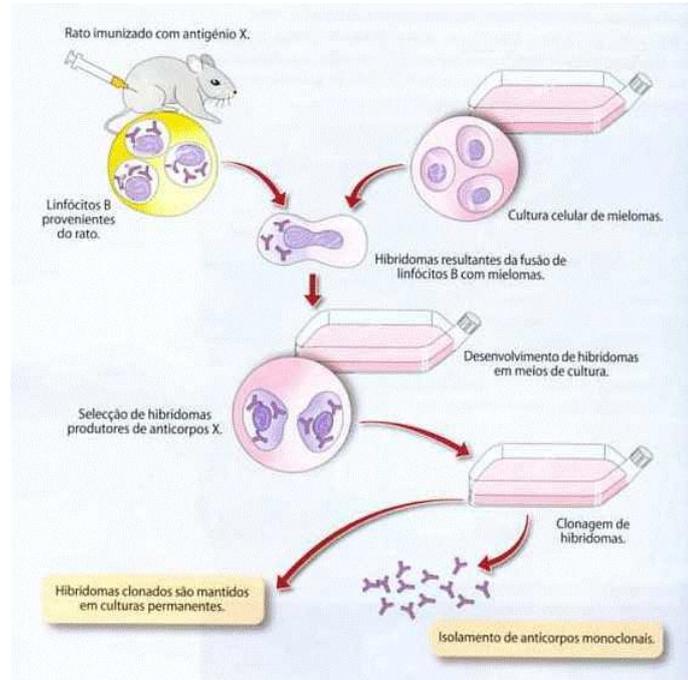


Figura 3.2: Esquema ilustrativo das etapas seguidas para obtenção de hibridomas

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 (em torno de US\$ 10^6 /kg) e as inúmeras aplicações do produto que incluem 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 , 1990; Rouger, 1997; Kretzmer, 2002; Pavlou e Belsey, 2005).

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 têm sido produzidas em escala industrial com a conseqüente diminuição dos custos de produto final e maior disponibilização ao homem.

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.

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. Mesmo assim o desenvolvimento da tecnologia dos hibridomas permitiu a geração de proteínas que poderiam se ligar especificamente a quase qualquer alvo.

Embora com as possibilidades clínicas imediatamente óbvias, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais como um produto de mercado levou algum tempo (Kozlowski e Swann, 2006). O primeiro anticorpo monoclonal terapêutico, Muromonab-CD3, marcador de uma proteína receptora complexa em células T, foi aprovado em 1986. O segundo anticorpo foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1994. Em 2004 existiam 17 novos anticorpos aprovados.

O FDA aprovou apenas 1 novo anticorpo monoclonal em cada ano em 2007 e 2008. Até o final de 2008, haviam 25 AMs em teste na fase 3, pelo menos 30 na fase 2 e 7 esperando aprovação pelo FDA (Maggon, 2008). Em junho de 2011, já eram 28 AMs aprovados no mercado (Elvin et al, 2012).

Seguindo o sucesso das proteínas recombinantes, os anticorpos monoclonais terapêuticos representaram a segunda onda de inovações criadas pela indústria de biotecnologia durante os últimos 20 anos. Entre 2001 e 2002 o valor de mercado global de um AM terapêutico cresceu 37% (Reichert e Pavlou, 2004).

As vendas globais de AMs em 2008 foram de 37 bilhões de dólares, comparados com 23 bilhões em 2007 (Maggon, 2008). Em 2009 foram 40 bilhões de dólares e em 2010 chegou a 48 bilhões.

As vendas combinadas dos top 10 do mercado foram de 45 bilhões de dólares. Se contar os 10 bilhões nas vendas de AMs para diagnóstico e como reagentes em pesquisa, então o total no mercado chegou a 55 bilhões de dólares (Maggon, 2010).

A crescente demanda por AMs impulsiona e estimula a otimização dos processos de produção das 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 larga escala (Legazpi et al., 2005).

3.2 CRESCIMENTO CELULAR

As células animais podem ser dependentes ou não de suporte para crescimento. As que dependem de suporte são chamadas de células aderentes. Tais células crescem em monocamadas, apresentando inibição por contato e tendo geralmente seu crescimento limitado pela superfície disponível do suporte. Células não dependentes de suporte desenvolvem-se em suspensão sem a necessidade de estarem aderidas a uma superfície. Mesmo as células aderentes também podem ser adaptadas a cultivos em suspensão (Moraes et al., 2007).

A fórmula assumida pela célula geralmente reflete sua origem. Células derivadas do sangue e/ou tumorais (como as provenientes de linfomas) costumam apresentar crescimento em suspensão, enquanto que células derivadas de tecidos sólidos (como rim e ovário) têm crescimento na forma aderente.

Atualmente, quando de posse de escolha, cultura 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, 2000).

Quando em cultura, células em diferentes fases do ciclo de crescimento comportam-se diferentemente em relação à proliferação, atividade enzimática, glicólise e respiração, síntese de produtos e muitas outras propriedades (Freshney, 2000).

As fases de crescimento celular podem ser divididas em fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log), fase estacionária ou platô e fase de declínio, como mostra a Figura 3.3.



Figura 3.3: Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.

A fase lag ocorre logo em seguida à inoculação das células. É um período de adaptação, onde as células não se dividem ou o fazem em baixas taxas específicas. A duração dessa fase depende das condições do inóculo e sua concentração inicial.

A fase exponencial é um período onde as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. Durante essa fase, as células estão em seu melhor estado fisiológico e, portanto, ideais para os estudos de função celular.

Na fase estacionária, os nutrientes estão escasseando e os produtos tóxicos estão tornando-se mais abundantes. Nesta etapa não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Pode haver aumento relativo na síntese de proteínas especializadas em vez de proteínas estruturais, além da modificação da constituição e da carga da superfície celular (Freshney, 2005).

Após a fase estacionária, segue-se a fase de declínio, na qual a maioria das células está em processo de morte embora outras ainda estejam se dividindo. A morte celular pode ser desencadeada por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose.

A necrose é considerada um mecanismo de morte acidental, resultante da exposição a altos níveis de estresse. Quase sempre acomete um grupo de células vizinhas e, *in vivo*, envolve inflamação. Já a apoptose é conhecida como morte celular programada. É resultante de níveis intermediários de estresse e ocorre mediante a ativação de um programa bioquímico caracterizado por uma série de alterações morfológicas, internamente controlado e não envolve inflamação *in vivo*.

A determinação de curva de crescimento é importante para a avaliação das características específicas de uma cultura celular. O comportamento e a bioquímica celular alteram-se significativamente em cada fase da curva. Conhecendo-se o ciclo de crescimento de cada linhagem celular pode-se prever a concentração de inóculo mais adequada, a duração prevista dos experimentos e os intervalos mais apropriados para amostragem ou adição de reagentes a serem testados (Moraes et al., 2007).

3.3 METABOLISMO DE CÉLULAS EM CULTURA

O conhecimento do metabolismo da célula em cultura é essencial para a formulação de um novo meio de cultura, para o planejamento de estratégias de alimentação em cultivos e para se obter altas produtividades tanto de células quanto de produto (Sanfeliu et al., 1997). A Figura 3.4 representa de forma geral os metabolismos mais relevantes de açúcares e glutamina de células animais em cultura (Altamirano et al., 2000).

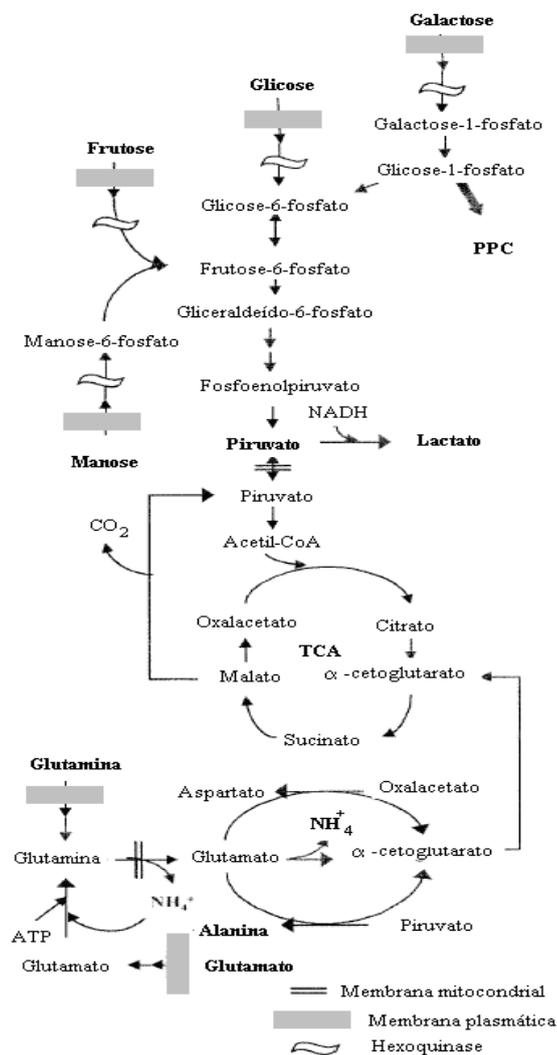


Figura 3.4: Visão geral dos principais metabolismos energéticos em uma célula animal. Adaptado de Altamirano e colaboradores (2000).

Quando células animais são cultivadas *in vitro*, alguns padrões gerais podem ser observados quando seu metabolismo central é analisado. As principais fontes de carbono e

energia para as células animais são glicose e glutamina e seu catabolismo é chamado de glicólise e glutaminólise, respectivamente. (Godia, 2002).

3.3.1 GLICOSE

As células, em geral, obtêm sua energia de reações de oxirredução, sendo a glicose a principal fonte para esta reação.

Na maioria das células de mamíferos, o mecanismo de transporte de glicose para o interior da célula é a difusão facilitada. Uma vez que, normalmente, a concentração de glicose livre no citosol é muito baixa, em decorrência de sua rápida fosforilação por hexoquinases, o transporte ocorre em direção ao interior da célula.

Quando a glicose entra no citosol, ela é rapidamente fosforilada por hexoquinases para produzir glicose 6-fosfato (G6P) que é logo catabolizada, principalmente através de duas vias: glicólise e ciclo das pentoses fosfato (PPC), como se observa na Figura 3.4.

Na via principal, a glicólise, a G6P é transformada em piruvato, gerando uma série de outros intermediários biossintéticos, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e duas de nicotina adenina dinucleotídeo (NADH). Através do PPC, a G6P é transformada em 6-fosfogliconato e em seguida a ribose-5-fosfato (R5P). Nessa etapa, o PPC permite a geração de equivalentes de redução NADPH requeridos na vias anabólicas, e R5P para a síntese de ácidos nucléicos.

Reitzer e colaboradores (1979) demonstraram que para diferentes linhagens celulares cultivadas em batelada, a velocidade específica de consumo de glicose depende da sua concentração no meio de cultivo. Para hibridomas, o valor pode flutuar entre 42×10^{-12} nmol. $\text{cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e 292×10^{-12} nmol. $\text{cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 5 e 16 mM de glicose no meio de cultura, respectivamente (Miller et al., 1988).

Outra observação foi feita em cultivos contínuos de hibridomas variando-se a concentração de glicose na alimentação. Demonstrou-se que a glicose era utilizada mais eficientemente à medida que se diminua sua concentração, gerando menos lactato (Sanfeliu et al., 1997; Hu et al., 1987). Esse autores determinaram em 77×10^{-12} nmol. $\text{cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a mínima

velocidade específica de consumo de glicose requerida para manter a concentração celular e sua viabilidade.

Em hibridomas cultivados sob condições de privação de glicose foi observado que as células entram em apoptose (Singh et al. 1994, Simpson et al. 1998). Experimentos realizados por Yeo e colaboradores (2006) demonstraram que células de hibridomas entram em apoptose de 2 a 4 horas após o término do substrato.

Tais observações conduzem à conclusão de que células de mamíferos cultivadas *in vitro* estão altamente desreguladas e na presença de concentrações de glicose não limitantes, consomem glicose a uma velocidade muito maior que a estritamente requerida para manter o crescimento celular. Uma hipótese para esse fato seria a formação de lactato a partir do piruvato, via lactato desidrogenase (LDH), que pode ser utilizada pela célula para equilibrar seu potencial redox (Sanfeliu et al, 1997).

3.3.2 GLUTAMINA

A glutamina é o segundo componente principal dos meios de cultivo empregados para o cultivo de células de mamíferos e também, a principal fonte de geração de amônio (Moraes, 2007).

Em condições normais de cultivo a 37°C, a glutamina sofre, parcialmente, uma decomposição química a ácido pirrolidina carboxílico e amônio, a uma velocidade entre 0,2 e 0,6 mM por dia. Além do seu importante papel como fonte de energia para a célula, através do fornecimento ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCAC), ela é também um importante bloco estrutural para o metabolismo celular, sendo requerida como fonte de nitrogênio na síntese de pirimidinas e purinas, açúcares aminados, NAD e asparagina.

O aminoácido L-Glutamina pode ser catabolizado por três caminhos diferentes. O primeiro é a completa oxidação através do TCAC. 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 e Wang, 1995). O primeiro passo da glutaminólise é feito pela conversão de glutamina a glutamato catalisada pela enzima glutaminase ativada por fosfato (PAG), que se localiza no espaço intermembrana da mitocôndria ou na matriz mitocondrial.

Similarmente ao que ocorre com a glicose na maioria das linhagens celulares utilizadas industrialmente, a glutamina é consumida a uma elevada velocidade, associada à alta concentração de glutamina que normalmente se utiliza na formulação do meio de cultivo. Isto conduz ao acúmulo de amônio e um ineficiente uso da glutamina. Miller et al (1989) observaram para uma linhagem de hibridoma, um aumento contínuo da velocidade específica de consumo de glutamina à medida que sua concentração aumentava na corrente de alimentação de um cultivo contínuo. Essas observações confirmam resultados anteriores verificados em cultivos em batelada (Miller et al, 1988).

Tal fenômeno é associado à alta atividade da PAG nas mitocôndrias de linhagens celulares imortalizadas (Matsuno et al., 1986). Reitzer et al concluíram que a glutamina, e não a glicose, era a principal fonte de energia em células HeLa, mesmo na presença de quantidades significativas de glicose.

As linhagens celulares imortalizadas são sistemas energéticos eficazes, contudo, se mostram mais ineficientes quanto à utilização da energia armazenada, uma vez que dissipam a maior parte desta, sem benefício aparente.

Alguns autores observaram em cultivos de hibridomas que a concentração de glicose no meio de cultura regula inversamente o metabolismo da glutamina. O aumento da concentração de glicose reduz o consumo de glutamina e a diminuição da concentração de glicose ou a substituição da glicose por outros açúcares como frutose ou galactose estimula o consumo de glutamina. Também, altas concentrações de glutamina aumentam a taxa de consumo específico deste substrato (Miller et al., 1988; Jeong e Wang, 1995).

Já foi demonstrado em cultivos de hibridomas murinos que glutamina em concentrações menores que 1-2 mM são inibidoras do crescimento celular, conseqüentemente diminuindo a viabilidade celular (Jeong e Wang, 1995). Outro fator importante é que a diminuição da concentração de 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 e Wang, 1995).

3.3.3 OUTROS AMINOÁCIDOS

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.

Quando as células animais são cultivadas *in vitro*, exibem diversos perfis de consumo de aminoácidos que seguem algumas tendências gerais, embora se possam verificar variações para cada linhagem celular em particular. O catabolismo dos vinte diferentes aminoácidos converge a um número reduzido de compostos intermediários.

Um dos aminoácidos consumidos mais rapidamente é a cisteína (Sanfeliu et al, 1996). Ela tem um papel importante na conformação das proteínas e em sua atividade biológica, unindo as cadeias peptídicas através de pontes dissulfeto. Singh e colaboradores (1997) demonstraram em cultivos de hibridomas que a cisteína e metionina em baixos níveis levam à morte celular por apoptose.

Alguns aminoácidos são produzidos e secretados pelas células em diversas condições de cultivo e estado fisiológico celular: alanina, prolina, aspartato, asparagina e glutamato. A alanina é produzida em grandes quantidades através da reação catalisada pela alanina aminotransferase (AlaTA). Um alto metabolismo da glutamina está relacionado com a produção de alanina no cultivo, até 40% da glutamina consumida pode ser dirigida para a formação de alanina como produto final (Moraes et al., 2007).

A prolina é sintetizada diretamente do acúmulo intracelular do glutamato. Ela é utilizada na formação de imunoglobulinas impedindo a formação de uma estrutura globular. O glutamato também se acumula no meio de cultivo tipicamente quando as células param seu crescimento e o acúmulo intracelular de glutamato não pode ser processado mediante outras reações metabólicas. Já a asparagina é formada pela amidação do aspartato via asparagina sintetase.

3.3.4 OXIGÊNIO

Todas as culturas de células animais são processos aeróbicos nos quais a necessidade de oxigênio varia entre as linhagens celulares (Spier e Griffiths, 1982).

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, e 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). Portanto, desde que se objetivem 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 (Bailey e Ollis, 1986). O oxigênio deve, portanto ser considerado um nutriente semelhante a outros dissolvidos no meio de cultura tais como glicose e aminoácidos.

Para procedimentos de aumento de escala, o suprimento de oxigênio pode afetar severamente a formação do produto. O suprimento adequado de oxigênio é frequentemente necessário para produção de energia e formação de constituintes celulares tais como tirosina e colesterol (Blanch e Clark, 1996).

A Tabela 3.3 apresenta diferentes determinações da velocidade específica de respiração celular para células animais, presentes na literatura.

Tabela 3.3: Valores de velocidade específica de respiração celular para diversas linhagens celulares (Ruffieux et al., 1998).

$q_{O_2} \times 10^{-12}$ (mol O ₂ cell ⁻¹ h ⁻¹)	Cell line	Reference
0.15–0.36	KS1/4 (hybridoma)	Backer et al., 1988
0.21–0.25	NB1 (hybridoma)	Boraston et al., 1984
0.234 ± 0.014	C1a (hybridoma)	Dorresteyn et al., 1996
0.05	FS-4 (Human diploid cells)	Fleischaker and Sinskey, 1981
0.19–0.4	AB2-143.2 (hybridoma)	Miller et al., 1987, 1988a,b
0.023–0.087	167.4G5.3 (hybridoma)	Ozturk and Palsson, 1990
0.33–0.37	HB-32 (hybridoma)	Ramirez and Mutharasan, 1990
0.15	Hybridoma	Singh, 1996
0.219–0.406	NSO (myeloma)	Yoon and Konstantinov, 1994
0.46 ± 0.05	MAK (hybridoma)	Zhou and Hu, 1994
0.23–0.42	X-D (hybridoma)	Hiller et al., 1991

Reuveny e colaboradores (1985) observaram que a produção específica de anticorpo é uma função da concentração de oxigênio dissolvido. A concentração ótima de oxigênio dissolvido para formação de anticorpo pode ser diferente daquela usada para alcançar altas densidades celulares (William et al, 1987).

Miller et al (1987) relataram em cultivos contínuos de hibridomas, um aumento no número de células viáveis e totais quando a concentração de oxigênio dissolvido foi diminuída até um valor crítico de 0,5% de saturação de ar, enquanto que a concentração ótima para produção de anticorpo foi de 50% de saturação de ar. Entretanto, um outro grupo (Mizrahi, 1982) encontrou exatamente o oposto para cultivos de células linfoblastoides humanas. Eles também mostraram a importância de manter uma concentração de oxigênio dissolvido estável para se obter uma produção constante de anticorpo.

O conhecimento da velocidade de consumo de oxigênio não é apenas útil para aumento de escala, mas também proporciona informações consideráveis sobre atividade celular (Yamada et al, 1990) e fisiologia, tanto quanto a estimação do número de células viáveis (Fleischaker e Sinskey, 1981).

3.3.4 SUBPRODUTOS

Em consequência da desregulação metabólica das células de mamíferos cultivadas *in vitro*, ocorre um rápido esgotamento da glicose e da glutamina, produzindo grandes quantidades de ácido lático e íon amônio que são metabólitos tóxicos (substâncias indesejadas ao cultivo celular) (Sanfeliu et al., 1997).

Dessa maneira, o crescimento e a viabilidade celular são prejudicados pelo progressivo esgotamento dos nutrientes e também pelo efeito negativo (inibitório ou tóxico) do acúmulo dos metabólitos, principalmente lactato e amônio.

A ação tóxica do acúmulo de lactato é devida ao efeito da diminuição do pH e aumento da osmolalidade do meio de cultura. Em sistemas de cultivo sem controle de pH requer-se o uso de metodologias para tentar controlar e evitar o efeito negativo. Em sistemas com controle, concentrações altas de lactato (20-60) mM (dependendo da linhagem de células em estudo) se tornam indesejáveis ao cultivo por 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; Patel et al, 2000; Zhang et al., 2004).

O acúmulo de lactato causa efeitos de maior importância em sistemas de cultivo em batelada alimentada, já que há um aumento crescente do consumo de glicose e consequentemente aumento do acúmulo de lactato (Moraes et al., 2007).

Com relação a formação de produto em cultivos de hibridomas, um efeito de inibição já foi reportado para concentrações de lactato acima de 20mM (Glacken et al., 1986).

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 de hibridomas dependendo da linhagem celular e as condições de trabalho (McQueen e Bailey, 1990; Newland, et al., 1990; Ozturk, et al., 1992; Newland, et al., 1994; Capiaumont, et al., 1995; Schneider et al., 1996).

Mas já foram realizados cultivos celulares com células CHO cultivadas em quimiostato e hibridomas adaptados para crescer em condições de amônio previamente tóxicas, em que não houve efeito tóxico até níveis relativamente altos (Hansen e Emborg, 1994; Miller et al, 1988). Para essas condições já foi observado que as células capazes de se adaptar a níveis mais altos de amônio aumentam a porcentagem de glutamina metabolizada via AlaTa, aumentando a produção final de alanina e diminuindo a geração de amônio livre em seu metabolismo.

Quanto à influência do amônio sobre o produto obtido nos cultivos, devem ser considerados qualidade e quantidade. Para a quantidade, os resultados indicam que a velocidade específica de produção parece ser dependente da linhagem celular. Alguns autores verificaram diminuição na produtividade, outros observaram um aumento e outros não

detectaram nenhuma influência (Ozturk, 1992; Yang e Butler, 2000, Hansen e Emborg, 1994). Há mais consenso quando se avalia o papel do amônio no padrão de glicosilação do produto obtido, havendo evidências de efeitos adversos (Gawlitzeck et al, 1998).

Sendo 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).

3.3.5 INFLUÊNCIA DO PH

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 e Palsson (1991) e Ozturk et al. (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.

O nível de pH é um bom indicador de crescimento celular, uma vez que no aumento da biomassa há a geração de ácido láctico abaixando o pH do meio (Hanson et al, 2007). Nos cultivos em batelada, durante a fase de crescimento, um decréscimo rápido no pH reflete o aumento na biomassa total e do metabolismo celular. Monitorar o nível de pH pode gerar também informações sobre apoptose, uma vez que já foi mostrado que a acidificação está relacionada com a morte celular em cultivos de hibridomas (Simpson et al., 1997; Perani et al., 1998).

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 (Moraes et al., 2007).

3.3.6 REDUÇÃO DE METABÓLITOS TÓXICOS

A evidência de que altas concentrações de glicose e glutamina no meio aumentam as velocidades específicas de consumo de ambos a níveis desnecessariamente altos deu início a definição de estratégias de alimentação em sistemas que operam em batelada alimentada ou em perfusão, no intuito de manter baixas as concentrações desses compostos no meio de cultivo e proporcionar a alimentação necessária para manter a atividade metabólica das células sem limitações (Xie e Wang, 1994; Zhou et al., 1995).

Outro método para tentativa de reduzir metabólitos tóxicos seria a substituição da glicose e/ou glutamina por compostos lentamente metabolizáveis. Em relação a glutamina, uma opção é sua substituição por peptídeos como, glicil-L-glicil-L-glutamina, L-alanil-L-glutamina ou glutamato (Atanassov, 1998, Christie e Butler, 1994, Altamirano et al., 2000). A vantagem do uso de peptídeos ou de glutamato é sua estabilidade térmica, permitindo inclusive a esterilização térmica dos meios, uma vantagem importante do ponto de vista de processos.

Para o uso de glutamato é necessário certificar que a linhagem de células em cultivo possui todo o arcabouço enzimático necessário para o metabolismo na ausência de L-Glutamina. Por exemplo, em hibridomas não haverá crescimento pelo uso de glutamato, a menos que as células sejam modificadas geneticamente (Hassel e Butler, 1999).

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 glicose, porém observaram uma diminuição na taxa de conversão de 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 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.

3.4 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura é um dos fatores mais importantes no cultivo de células animais. Sua função é proporcionar pH e osmolalidade apropriados para a sobrevivência e multiplicação da célula e também fornecer todas as substâncias químicas requeridas pela célula, as quais esta não é capaz de sintetizar.

Enquanto alguns meios de cultura são formulados para promover a multiplicação celular (meios de crescimento), outros apenas mantêm a integridade estrutural e metabólica das células, mas não estimulam a divisão celular (meios de manutenção).

Alguns meios de destaque no cultivo de linhagens contínuas de células de mamíferos são entre outros, o meio mínimo essencial de Eagle MEM, o meio de Eagle modificado por Dulbeco DMEM, o meio RPMI 1640, o meio CMRL 1066 e o meio F12 de Ham, suplementados ou não com soro ou com proteínas.

Para a manutenção das condições do tecido original do qual a célula é oriunda, faz-se necessário um meio líquido que possua, entre outras substâncias específicas para determinadas linhagens celulares, sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água. Por vezes, também se requer a adição de antibióticos e soro (Moraes et al., 2007).

Informações sobre o metabolismo das células animais são fundamentais para a formulação de novos meios de cultivo, assim como para definição da melhor estratégia de alimentação de nutrientes (batelada, batelada alimentada e contínua) e de procedimentos para a obtenção de bioprodutos de interesse.

Avanços no meio de cultura facilitaram o avanço em tecnologia de biorreatores nas últimas décadas. As concentrações de imunoglobulinas recombinantes tiveram um considerável aumento de 50 mg/L para cerca de 10 g/L (Elvin et al, 2012).

3.4.1 O USO DE SORO

O soro, normalmente proveniente de bezerros e fetos bovinos, contém aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas, hormônios, lipídeos e minerais, entre outros. Também pode se empregar soro de eqüinos e mesmo soro humano, mas são menos comuns.

As principais funções do soro são estimular o crescimento e outras atividades celulares, aumentar a adesão celular por proteínas específicas e fornecer proteínas para o transporte de hormônios, minerais e lipídeos (Freshney, 2005).

O soro fetal bovino (SFB) é o favorito por apresentar menores concentrações de imunoglobulinas e elevada proporção de fatores de crescimento. 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.

Nos últimos anos houve forte recomendação por parte das agências reguladoras, como a FDA (Food and Drug Administration, EUA) de não se utilizar produtos de origem animal, como soro, na composição de meios de cultura celular para a produção de biofármacos e correlatos com aplicação terapêutica ou profilática em humanos. Por estas razões o soro tem sido substituído por aditivos como sais inorgânicos de ferro (Legazpi et al., 2005).

A inclusão de 0.1 – 0.5 mM de citrato de ferro em um meio quimicamente definido, livre de soro, mostrou um aumento de um terço na expressão de AM em células CHO (Bai et al, 2011).

Os problemas com o uso de meio de cultura livre de SFB surgem do não conhecimento total das necessidades nutricionais das células e conseqüentemente é impossível providenciar todos os componentes necessários em um meio quimicamente definido, com o inconveniente de perder o efeito de proteção que o SFB exerce contra as forças de cisalhamento.

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.

3.5 BIORREADORES PARA CULTIVO DE CÉLULA ANIMAL

Desde o início do cultivo de células animais *in vitro*, intensificaram-se os estudos voltados para a definição do conjunto de condições ambientais relevantes necessárias para a proliferação celular. Essa idéia, base para o desenvolvimento de meios de cultivo quimicamente definidos na década de 80, motivou também o estudo das condições físico-químicas essenciais para o cultivo celular com fins tecnológicos. Como consequência prática desses estudos surgiram os biorreatores destinados ao cultivo de células animais.

Este sistema de cultivo deve garantir a esterilidade do processo e garantir o controle e monitoramento dos principais parâmetros do processo (temperatura, pH, concentração oxigênio dissolvido, agitação).

Para o propósito da pesquisa, frascos agitados e spinners são usualmente o sistema escolhido, pois são de fácil utilização e não necessitam de equipamentos de alto custo, além de serem facilmente modificados para adaptação de equipamentos de aeração. Frascos spinner estão disponíveis com volumes variando de 25 mL até 36 L, com 32-80% de capacidade de volume de trabalho e agitação de 50 a 150 rpm.

Quando a necessidade de volume de cultura excede 1L, a produção de proteínas de maneira satisfatória requer a utilização de ambientes de cultura com maior controle dos parâmetros do processo – biorreatores. Um biorreator usualmente possui eletrodos ou sensores que permitem o conhecimento de determinados parâmetros do ambiente onde as células estão sendo cultivadas, permitindo o constante monitoramento, controle e otimização das condições de cultivo.

3.5.1 TIPOS DE BIORREADORES

Uma das formas mais úteis para se classificar o tipo de biorreatores é de acordo com a homogeneidade do sistema. Os biorreatores, nos quais as células se encontram uniformemente suspensas na fase líquida são denominados homogêneos. Já aqueles onde as células permanecem aderidas a uma superfície ou imobilizadas no interior de um leito biocompatível são chamados de heterogêneos (Moraes et al., 2007). A Tabela 3.4 lista diferentes tipos de biorreatores segundo a homogeneidade do sistema.

Tabela 3.4: Classificação dos biorreatores segundo a homogeneidade do sistema.

Biorreatores	
Homogêneos	Heterogêneos
<ul style="list-style-type: none"> - biorreatores do tipo tanque agitado - biorreatores do tipo air-lift - biorreatores de ondas (wave) 	<ul style="list-style-type: none"> - sistemas com microcarregadores - biorreatores de leito empacotado - biorreatores de leito fluidizado - biorreatores de fibras ocas - biorreatores com crescimento sobre superfície.

Biorreatores do tipo tanque agitado

São os preferidos no aumento de escala de células em suspensão. Os parâmetros básicos de um processo biotecnológico, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, dentre outros, são medidos e controlados utilizando dispositivos padrões disponíveis nos biorreatores tanque agitados comerciais (Kretzmer, 2002).

Os biorreatores convencionais de tanque agitado (BTA) têm sido utilizados para cultivo de células em larga escala com volumes variando de 2 a 10.000 litros. A maior parte dos produtos oriundos do cultivo de células animais em grande escala no mundo é fabricada com base neste tipo de biorreator (Chu e Robinson, 2001).

Possibilitam tanto o crescimento de células em suspensão quanto células dependentes de ancoramento, possuem facilidade de aumento de escala, provêm um ambiente homogêneo para o crescimento celular e possibilitam o controle da qualidade do produto de maneira relativamente fácil. São portanto, ferramentas importantes na produção de biofármacos (Wang et al., 2005).

Células em suspensão produzindo anticorpos monoclonais já foram cultivadas em BTA com volumes na faixa de 10.000L (Chu e Robinson, 2001).

Biorreatores de ondas (wave)

Este tipo de biorreator consiste em duas partes principais: uma bolsa estéril de plástico flexível, na qual se cultivam as células e uma plataforma móvel sobre a qual essa bolsa fica apoiada.

A bolsa fornecida pelo fabricante já vem estéril e é descartável, portanto não é necessário limpar ou esterilizar. Essas são características atrativas para fins produtivos, especialmente quando a escala de produção não é muito grande.

A plataforma agitada gera ondas que asseguram a transferência de oxigênio, e uma boa distribuição de nutrientes e suspensão de células. Meio de cultura pode ser adicionado progressivamente até atingir o volume final do saco que podem variar de 0,1 até 500 L.

Tang e colaboradores (2007) cultivaram com sucesso hibridomas produzindo IgG neste tipo de biorreator com 1 L de volume.

Biorreatores do tipo Air-Lift

Esses biorreatores são caracterizados pela elevada razão altura/diâmetro e pela existência de um cilindro concêntrico em seu interior. Na região central inferior, há um tubo que injeta a corrente gasosa no biorreator. O gás sob pressão gera bolhas que resultam em uma região de baixa densidade no interior do tubo central. Quando essas bolhas ascendem, fazem o líquido circular para cima pela região interna do cilindro e regressar para baixo pela região anular externa, fazendo a oxigenação de forma efetiva pelo contato da suspensão com as bolhas ascendentes.

Podem funcionar em qualquer modo de operação, mas sua desvantagem vem do fato de ter uma capacidade relativamente limitada de ampliação de escala, sendo descritos biorreatores deste tipo de até 5.000L.

Birch e colaboradores (1985) usaram este tipo de biorreator com volume de 1,000 L para produção de anticorpos monoclonais. Cada cultivo durou em torno de 400 dias, com a produção de anticorpos sendo mais alta na fase estacionária e de declínio.

Cultivos de hibridomas já foram reportados em biorreatores air lift com volumes de até 2.000L (Kretzmer, 2002).

A Figura 3.5 apresenta uma representação dos tipos de biorreatores descritos até agora.

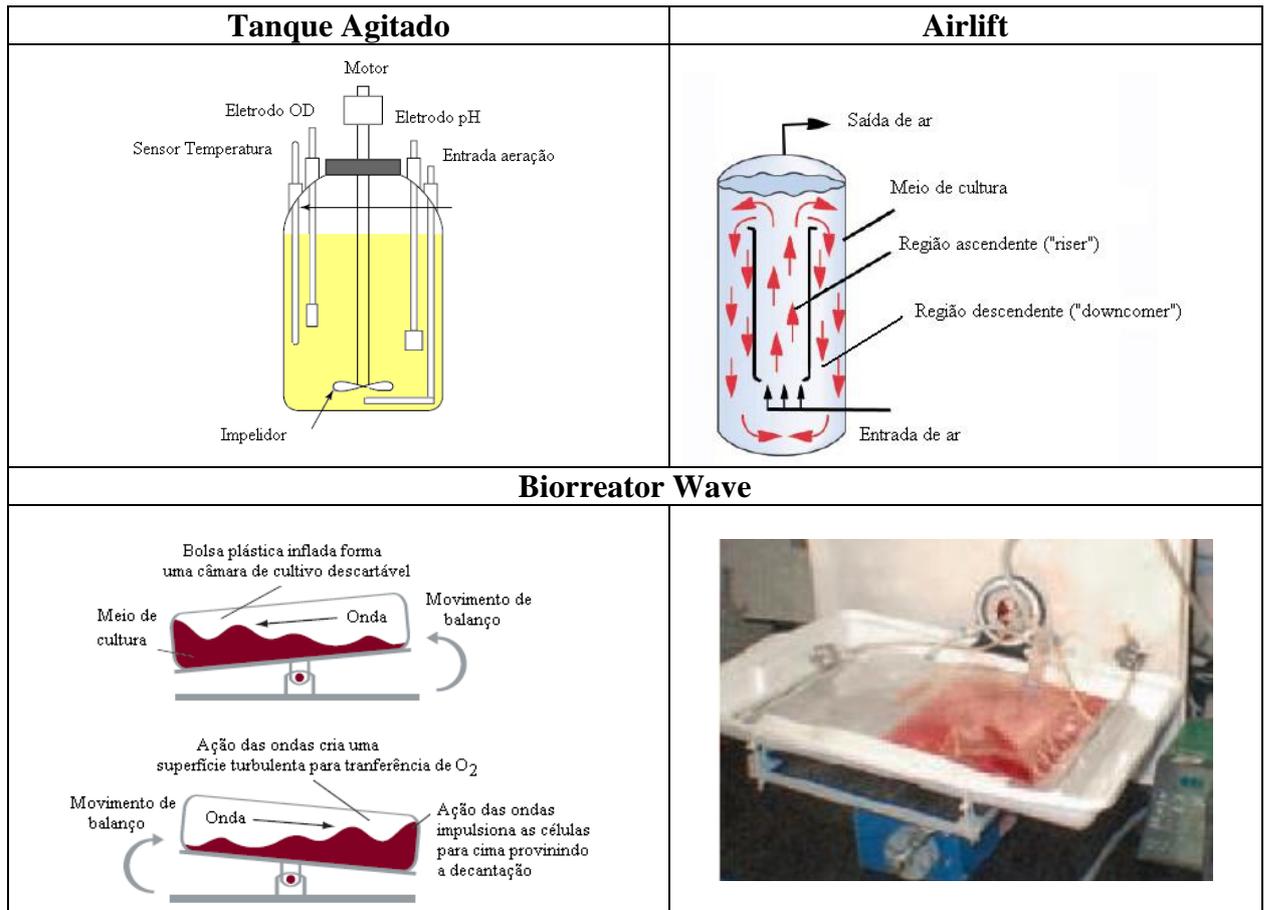


Figura 3.5: Exemplos de biorreatores homogêneos.

Biorreator de fibras ocas (*hollow fiber bioreactor*)

O núcleo desse tipo de biorreator consiste em um cilindro plástico que contém centenas de membranas semipermeáveis na forma de capilares, conhecidas como fibras ocas. As células são inoculadas no espaço exterior às fibras e crescem nessa região. O meio de cultivo é bombeado através do espaço interior das fibras, conhecido como espaço intracapilar.

São preferencialmente utilizados com produtos de menor demanda. Suas dimensões reduzidas permitem facilmente a operação de diversas unidades em paralelo, para a obtenção de diferentes produtos.

Para a produção de anticorpos monoclonais, tais biorreatores constituem um sistema otimizado de produção nos quais é possível atingir facilmente concentrações celulares elevadas – 10^7 a 10^8 cel mL⁻¹ e consequentemente concentrações de produto da ordem de 0,7

a $2,3 \text{ g L}^{-1}$, valores esses similares aos obtidos com a produção de anticorpos *in vivo* (Hendriksen e Leeuw, 1998).

3.5.2 MODOS DE OPERAÇÃO

Biorreatores podem ser operados de diferentes maneiras relacionadas ao modo como os nutrientes são fornecidos para as células: cultivo descontínuo (batelada), cultivo descontínuo alimentado (batelada alimentada), cultivo contínuo e cultivo contínuo com retenção de células também conhecido como perfusão.

Batelada

Modo de operação descontínuo no qual não há suplemento adicional de substrato após a inoculação das células. Devido à baixa solubilidade do O_2 , este deve ser suprido continuamente e não como os demais nutrientes. O controle do pH é feito por adição de base ou variando a concentração de dióxido de carbono na fase gasosa.

É o modo mais simples de ser executado, o que o torna um dos mais empregados. De modo geral, é utilizado nos frascos de cultivo estacionários, nos frascos agitados e em biorreatores de pequeno e médio volume para propagação do inóculo, mas também em algumas indústrias na escala de produção.

Apesar deste tipo de cultura ser limitada devido à exaustão de nutrientes chaves ou acúmulo de subprodutos tóxicos, o cultivo em batelada, se iniciado com um meio de cultura cuidadosamente formulado, pode resultar em ótimos rendimentos com mínimo custo. No entanto a utilização de outros modos de operação tem se tornado mais intensa uma vez que a alimentação do biorreator com nutrientes pode reduzir a formação de subprodutos tóxicos e a flutuação nas concentrações dos nutrientes chaves aumentando tanto o rendimento celular quanto a produtividade da proteína recombinante (Chu e Robinson, 2001).

Batelada alimentada

A diferença desse modo para o de batelada reside no fato de administrar-se um ou mais nutrientes durante o cultivo, para repor aqueles consumidos pelas células.

O uso de estratégias otimizadas, baseadas nas taxas específicas de consumo de cada nutriente permite alcançar concentrações de biomassa até 2,5 vezes superiores observadas no modo batelada. O mais relevante nesse modo de operação é que a concentração de produto pode ser significativamente aumentada, quando comparada ao cultivo em batelada.

A desvantagem da batelada alimentada está no fato do acúmulo de metabólitos tóxicos que limitam a produtividade podendo inibir o crescimento e afetar a viabilidade celular. Outra desvantagem é o longo tempo de residência do produto no ambiente de cultivo. Assim uma molécula de produto secretada no início do processo permanece quase o tempo total da corrida dentro do biorreator, na presença de proteases e glicosidases (Goochee e Monica, 1990).

A Tabela 3.5 mostra uma comparação de diferentes linhagens de hibridomas cultivadas em batelada e batelada alimentada em diferentes meios de cultivo.

Tabela 3.5: Cultivos de hibridomas em batelada e batelada alimentada.

Operação	Células	Meio	Reator	Xviáveis (cel/mL)	Proteína (mg/L)	Referência
Batelada Bat. alimentada	hibridoma murino produzindo anti-fibronectin	IMDM	Tanque Agitado	0,36.10 ⁹ 3.10 ⁹	9 400	Shibuya et al., 2008
Batelada	Hibridoma RC1	RPMI 13,5% SFB	Tanque agitado Miniperm	4.8.10 ⁵ 7,6.10 ⁵	420 370	Mel et al., 2008
Batelada Bat. alimentada	hibridoma murino produzindo contra tissue factor	DMEM + F12 + complementos	Tanque Agitado	1,37.10 ⁶ 7,04.10 ⁶	136 707	Gong et al., 2006
Batelada Bat. alimentada	NS0 Glicose	CNM3	Tanque Agitado	2,32. 10 ⁶ 2,46.10 ⁶	214 241	Dempsey et al., 2003
Batelada Bat. alimentada	human embryonic kidney cell line	DMEM + F12	Tanque Agitado	1,51.10 ⁶ 4,11.10 ⁶	n.d.	Lee et al., 1999
Batelada	hibridoma murino produzindo IgG	DMEM + RPMI	Tanque Agitado	104,4.10 ⁷	34,2	Jang e Barford, 2000

Bat. alimentada				312,8.10 ⁷	73,3	
Batelada	BHK produzindo IgG	DMEM	Tanque Agitado	1,1.10 ⁶	1	Cruz et al., 2000
Bat. alimentada				2,5.10 ⁶	1,6	
Batelada	Hibridoma murino produzindo IgG contra ant CD3 linfócito	DMEM	Tanque Agitado	2,5.10 ⁶	1	Cherlet e Marc 2000
Batelada	Hibridoma murino	RPMI + 10%SFB	Frasco T Tanque agitado	2.10 ⁶	42 150	Stoll et al.,1997

Cultivos contínuos com retenção de biomassa

Também conhecido como perfusão, é o modo de cultivo mais produtivo e ao mesmo tempo o mais complexo. As células são retidas dentro do biorreator empregando-se um dispositivo de retenção celular. Assim é possível resolver a maior limitação do sistema contínuo que é a reduzida produtividade decorrente da perda de células na saída do biorreator.

As principais características desse modo de operação são: maior produtividade volumétrica, tempo de residência curto, ideal para a produção de moléculas lábeis, mas maior risco de contaminação microbiana, por consistir em um sistema aberto que opera por longos períodos.

Cultivos em perfusão de hibridomas já foram relatados na literatura. Rodrigues e colaboradores (1999) cultivando hibridomas em biorreatores de fibra oca de 3L operando em perfusão alimentada conseguiu 300% mais células viáveis e 10 vezes mais produtos do que uma perfusão normal. Feng et al (2006) comparando batelada com perfusão, conseguiu 6 vezes mais células viáveis e 3 vezes mais concentração de produto em cultivos de hibridomas em volume de 5L, produzindo IgG contra carcinomas.

3.5.3 AERAÇÃO E AGITAÇÃO

Um dos maiores obstáculos no aumento de escala de biorreatores é satisfazer a alta demanda de oxigênio de culturas com altas concentrações celulares em culturas em larga escala. Devido à baixa solubilidade do oxigênio e baixa área interfacial líquido-gás, a aeração superficial não pode suprir a demanda de transferência de oxigênio nestas culturas. Este tipo de problema pode ser resolvido através da utilização de uma aspersão direta de ar ao meio de cultura ou altas velocidades de agitação. No entanto, a combinação da aspersão e da agitação

do biorreator gera forças fluido-mecânicas de uma magnitude capaz de danificar as células. Apesar do considerável progresso na caracterização das forças que causam danos às células, seu efeito na fisiologia e viabilidade da célula ainda é pouco conhecido (Kioukia et al., 1996).

A dimensão do cisalhamento no desenvolvimento de uma bioprocessos tem sido motivo de um grande número de pesquisas com o objetivo de identificar os determinantes dos danos celulares e a maneira de minimizá-los (Kioukia et al., 1996).

Os danos celulares provocados pela aspersão de gases são considerados como a principal barreira para a produção em larga escala de biológicos recombinantes em cultura de células animais e de inseto em suspensão. Estes danos estão associados à interação da célula com as bolhas que se rompem na superfície líquido-gás. Quando uma bolha se rompe, a liberação repentina de sua energia superficial resulta na rápida desintegração do filme da bolha e do fluxo do fluido abaixo da bolha. A alta velocidade de fluido resultante deste rompimento da bolha gera intenso estresse hidrodinâmico e causa sérios danos celulares na região ao redor da bolha.

A interação agitação mecânica/borbulhamento também foi estudada por Michaels e colaboradores (1996) demonstrando que, sem a presença de borbulhamento, a agitação mecânica sob condições de cultura típicas não danifica células livres em suspensão. Isto também foi verificado por Chisti (2001) que estudou especificamente a hidrodinâmica de danos não relacionados ao borbulhamento. Chisti (2000) afirma que os danos associados ao borbulhamento podem ser aumentados pela agitação com impelidores, especialmente se o impelidor divide as bolhas distribuídas pelo aspersor

Uma alternativa para minimizar os danos às células animais causados pelo cisalhamento é a utilização de aditivos para o meio de cultura, dentre eles o soro fetal bovino (SFB), metilcelulose (MC), Pluronic F-68 (o mais usado e estudado) e polietilenoglicol (PEG). Chisti (2000) pesquisou e comparou estes aditivos concluindo que efetivamente protegem a célula contra os danos causados pelo borbulhamento

Apesar dos benefícios causados pela adição de surfactantes, estes agentes podem causar complicações nas etapas de separação e purificação. Existe, portanto, uma necessidade de uma forma alternativa de aeração que origine tensões de cisalhamento mínimas no biorreator. A utilização de membranas tubulares para aeração de biorreatores em cultivos de células de mamíferos oferece um suprimento de oxigênio adequado com mínimo estresse. Estas membranas tubulares são feitas de materiais como silicone e Teflon, que

possuem altas permeabilidades de gás, possibilitando altas velocidades de transferência de gás entre a membrana e o meio contido no biorreator. Células de mamíferos tem sido cultivadas com sucesso em biorreatores de membrana (Ducommun et al., 2000; Schneider, et al. 1995).

3.6 COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fazendo uma avaliação da literatura mostrada sobre AMs produzidos por hibridomas pode-se dizer que há muita informação sobre esse assunto, abrangendo aspectos que vão desde biologia molecular até a produção e purificação dessas glicoproteínas. No âmbito da Biotecnologia, a produção de AMs é a área que mostrou maiores avanços e realizações. Uma grande diversidade de anticorpos monoclonais produzidos por hibridomas tem sido objeto de estudo em diversas áreas da ciência e outro tanto tem sido objeto de interesse para comercialização. No entanto, como cada linhagem de hibridoma possui seu próprio elenco de características fisiológicas, estudos específicos de cada linhagem se tornam imprescindíveis quando se pretende desenvolver um bioprocessos para produção em larga escala de um AM. A identificação dessas características para os três hibridomas que se pretende utilizar neste estudo será de crucial importância para a otimização do processo de cultivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Células de hibridomas

Obtenção das linhagens de hibridomas:

As fusões celulares para a produção dos AMs foram realizadas utilizando: NS/1 (mieloma múltiplo) e linfócitos B de camundongo BALB/c imunizados, provenientes da extração do baço desses animais.

Os camundongos da linhagem isogênica BALB/c eram provenientes do biotério de Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu. As células utilizadas como parceiros de fusão celular foram células de mieloma múltiplo murino da linhagem NS/1, obtidos por Köhler e Milstein, provenientes de doação do *Laboratoire de Genie D'Institute National de Transfusion Sanguine* de Paris (INTS), integrante da *Agence Française du Sang*, mantidas em nitrogênio líquido.

As células foram ressuspensas em meio RPMI enriquecido em aminoácidos essenciais (GIBCO™) e não essenciais (GIBCO™) contendo 20% de soro fetal bovino (SFB). A relação linfócito/NS₁ foi de 1/10, tendo como agente fusionante o polietilenoglicol PM 4000 (MERK^R). Esta suspensão, após delicada homogeneização, foi distribuída em microplacas de cultura celular de 96 poços.

Após a realização da fusão celular com a distribuição das células nas placas, o meio seletivo HAT (GIBCO™) (hipoxantina, aminopterina e timidina) foi adicionado à cultura.

As células receberam, a partir da fusão, os seguintes meios: HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) nos primeiros quinze dias; HT (GIBCO™) (hipoxantina-timidina) durante os quinze dias seguintes e, a partir do trigésimo dia pós-fusão, meio RPMI 1640 (GIBCO™) completo.

A partir da primeira semana pós-fusão, as placas foram observadas diariamente para a verificação do desenvolvimento dos híbridos. Nos poços onde se verificou o crescimento de híbridos, o sobrenadante de cultura foi aspirado para a realização do *screening* (seleção dos híbridos obtidos). O método utilizado para *screening* foi a hemaglutinação direta onde se utilizou como antígeno as hemácias A1 e como anticorpo os sobrenadantes de cultura provenientes da fusão.

A expansão dos híbridos em cultura foi realizada após a verificação de híbridos positivos resultantes da fusão celular. Seu crescimento foi acompanhado e, à medida que as células preencheram os espaços na microplaca de 96 poços, foram repicadas para placas de poços maiores (24 poços por placa) e, em seguida, para frascos de 80cm³. Nesta fase foram congeladas quatro ampolas contendo células dos híbridos selecionados como positivos para assegurar sua conservação.

A partir da obtenção e congelamento dos híbridos, foi descongelada, inicialmente, uma ampola de cada híbrido, a fim de verificar-se o comportamento das células em meio de cultura.

A clonagem foi realizada pelo método de diluição limitante (Catty e Rayundalia, 1988).

Após a seleção dos clones obtidos, foi realizado novo *screening* pelo método de hemaglutinação direta, obtendo-se assim as linhagens celulares.

Linhagens de hibridomas utilizadas:

Foram utilizadas três linhagens de hibridomas murinos produtoras de imunoglobulinas (IgG-k) com especificidade a antígenos eritrocitários do sistema sanguíneo ABO:

1 – Hibridoma murino ED7 183 A12, ou simplesmente ED-7, produtora de imunoglobulina com especificidade a antígenos eritrocitários A (anti-A);

2 – Hibridoma murino ED9 355 A18, ou ED9, produtora de imunoglobulina com especificidade a antígenos eritrocitários AB (anti-AB);

3 – Hibridoma murino TAN 112 A18, ou TAN, produtora de imunoglobulina com especificidade a antígenos eritrocitários B (anti-B).

As linhagens dos hibridomas em estudo foram disponibilizadas pela Dra. Elenice Deffune e sua equipe do Hemocentro de Botucatu do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP).

4.1.2 Meio de Cultura

Foram utilizados dois meios de cultura:

1. **Mab Quantum Yield-BD**, suplementado com Soro Fetal bovino (SFB) 10% v/v (GIBCO™). Para simplificar este meio será chamado de MQYS.

2. **RPMI 1640** (GIBCO™) com adição de 10 % v/v de SFB e outros componentes importantes para os cultivos dos hibridomas murinos. A Tabela 4.1 apresenta de forma detalhada a composição deste meio. Doravante este meio será chamado de RPMIS.

Seguindo as recomendações do fabricante (GIBCO™) o pH do meio de cultura foi ajustado para ficar entre os valores 7,2 e 7,4, mediante o uso de solução de HCl 1M.

Tabela 4.1: Composição básica do meio de cultura utilizado nos cultivos dos hibridomas.

Componente	Quantidade
Meio RPMI 1640 em pó (GIBCO™)	10,4 g
Água Milli-Q	qsp 1000 ml
Solução de Glicose 30%p/v	12,0 ml
Piruvato de Sódio	10,0 ml
Glutamax (GIBCO™)	19,726 ml
Antibiótico-Antimicótico (GIBCO™)	10,0 ml
Ácido Oxalacético	10,0 ml
Insulina 100UI	2,0 ml
Mercaptoetanol	1,0 ml
Solução de Aminoácidos Essenciais(GIBCO™)	10,0 ml
Solução de Aminoácidos não Essencias (GIBCO™)	5,0ml
Bicarbonato de Sódio (P.A)	2,0 g

4.1.3 Corantes

Foi utilizada uma solução aquosa de 0,4% azul de Tripan (Trypan Blue, Sigma T-6146), como corante para o método de exclusão por corantes (Freshney, 2000).

4.1.4 Reagentes para ELISA

Para a análise de concentração de Imunoglobulinas pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), foram utilizados os seguintes materiais, anticorpos e tampões.

Placa de 96 poços (Greiner-Bio One)

Anticorpo de captura (*coat*):

Imunoglobulinas polivalentes anti-mouse produzida em cabra (M6149 – Sigma). Para sua utilização nas placas foi diluído em um tampão carbonato/bicarbonato (descrito mais adiante) na concentração de 40 µg/mL.

Anticorpos para a curva padrão:

Imunoglobulinas de mieloma murino purificadas (M 9269, SIGMA). Para a diluição e armazenamento em alíquotas utilizou-se um tampão TRIS em pH 8.0 diluído em água duplamente destilada, contendo: 0,15M de NaCl; 0,02 M TRIS e 0,02% NaN₃. Na diluição das alíquotas para uso na análise utilizou-se o próprio meio de cultivo. A curva padrão consistiu de concentrações de IgG variando de 0 a 400 ng/mL.

Anticorpo de detecção (*detect*)

Imunoglobulinas anti-mouse IgG conjugadas com fosfatase alcalina, produzidas em cabra (A 3562, SIGMA). Antes do uso foram feitas previamente alíquotas usando como tampão diluente uma solução em 0,05M TRIS, contendo 50% glicerol (neutralizado com NaOH), 1% de BSA, 1mM de MgCl₂ e 15mM de NaN₃. Para uso nas placas de leitura, as alíquotas foram diluídas 500X em uma solução TBS (descrita a seguir) com 2% de leite desnatado em pó.

Tampão TBS (*Tris buffered saline*)

Este tampão era utilizado na diluição da solução de bloqueio dos sítios feita com 5% de leite desnatado, na diluição dos anticorpos de detecção (como já mencionado) e também nas etapas de lavagem da placa. O tampão consistia de uma solução 0,15M de NaCl contendo 0,02M de TRIS em pH 8.0. Para a etapa de lavagem da placa adicionava-se a esta solução 0,05% de Tween 20.

Tampão carbonato/bicarbonato de sódio (carb/bicarb).

Preparavam-se 2 soluções de 0,1M de cada um. Com as 2 soluções prontas, adicionava-se a solução de carbonato na solução de bicarbonato de sódio medindo simultaneamente o pH até atingir 9,5 (pode ser entre 9,2 e 9,5).

4.2 EQUIPAMENTOS

4.2.1 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 foram manipuladas as células.

4.2.2 Incubadora

Durante os experimentos foi usada a incubadora de CO₂ Thermo Forma, modelo 311 com controle de % de CO₂ na atmosfera e de temperatura

4.2.3 Centrífuga

Nos métodos de centrifugação foi utilizada Centrífuga Excelsa Baby I marca FANEM®, modelo 206.

4.2.4 Microscópio

Para utilização dos métodos de determinação de concentração e de viabilidade celular foi utilizado um microscópio da marca Olympus, modelo BX51.

4.2.5 Sistema de filtração de meio de cultura

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.

4.2.6 Frascos de cultura e vidrarias

Foram utilizadas frascos de cultura celular (frascos T) de 25 cm^2 e 75 cm^2 da marca TPP de poliestireno com superfície tratada e estéril, frascos de vidro (marca BOECO, 250 mL, Alemanha), frascos spinner (marca WHEATON, 500 mL).

O biorreator utilizado foi do tipo tanque agitado de 2L (Bioflo 110 - New Brunswick Scientific, NJ, USA) equipado com eletrodos de pH e oxigênio dissolvido (Mettler Toledo); agitação por hélice marinha (3 pás); e adaptação do sistema de aeração por membrana de silicone (comprimento da mangueira 7,84m).

4.2.7 Espectrofotômetro de multiplacas

Para a leitura das absorbâncias das amostras pelo método de Elisa, utilizou-se a leitora de microplacas Multiskan FC da Thermo Scientific com filtro de 492 nm.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Determinação da concentração e viabilidade celular

O acompanhamento da concentração e da viabilidade celular durante o cultivo foi realizado através do método de exclusão de corante utilizando solução aquosa de 0,4% de azul de trypan (Freshney, 2000).

A concentração de células foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Para tal foram retiradas amostra do cultivo de 20µL que em seguida foram misturadas com 20 µL da solução de corante. Com ajuda de uma micropipeta coloca-se uma alíquota de 10 µL da amostra corada numa câmara de Neubauer previamente montada e fez-se a contagem no microscópio óptico com magnificação de 20 vezes. As células não coradas foram classificadas como células viáveis, já as células coradas com azul de tripan, foram classificadas como células inviáveis. A concentração celular foi calculada com o número de células totais de acordo com a equação 1. Já a viabilidade celular foi 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 percentagem da viabilidade celular

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

4.3.2 Análise de substratos, metabólitos e produto

Para análise de carboidratos utilizou-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com coluna de resina Aminex HPX-87H (Bio-rad), fase móvel H_2SO_4 5mM, temperatura de 65°C e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ em cromatógrafo Waters com detecção através do índice de refração (W410, Waters) para carboidratos e UV 210 nm para ácido láctico. A concentração de aminoácidos foi determinada também em HPLC, pelo sistema

Pico-tag utilizando coluna de fase reversa (Waters), detecção por UV 254 nm, de acordo com Cohen et al. (1989).

A análise da concentração de amônia foi feita através de um eletrodo seletivo, modelo ORION 710A (Thermo Scientific).

A quantidade de IgG-k total produzida foi quantificada usando um ELISA sanduíche de acordo com o protocolo geral da SIGMA, envolvendo anti-mouse IgG polivalente (M 6149, SIGMA) como coating, Anti-mouse IgG conjugado com fosfatase alcalina (A 3562, SIGMA) como anticorpo para detecção e Fosfatase alcalina amarela (pNPP) (P 7998, SIGMA) como substrato. O ensaio foi calibrado usando uma IgG₁-kappa de mieloma murino (M 9269, SIGMA) como padrão. Cada amostra de sobrenadante foi diluída adequadamente e analisada duas vezes. Os dados de diluições e tampões já foram descritos previamente. A absorbância foi medida a 492 nm.

A hemaglutinação e titulação (máxima diluição em que ocorre aglutinação) dos anticorpos foi realizada pelo laboratório do hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A titulação foi realizada pelo método direto com diluição seriada (Messeter et al., 1984).

4.3.3 Procedimento experimental utilizado nos experimentos

Durante as etapas do trabalho, foi realizado o procedimento experimental para os cultivos dos hibridomas, representado na Figura 4.1.

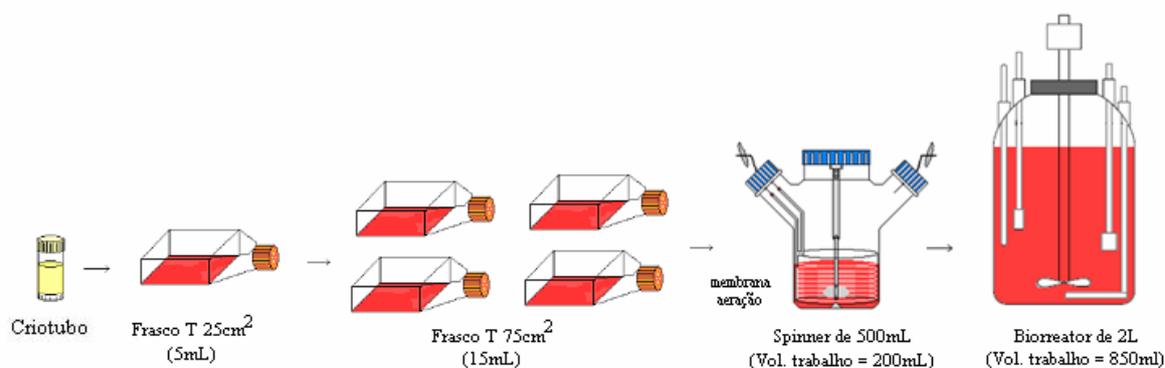


Figura 4.1: Representação esquemática dos procedimentos de cultivo dos hibridomas murinos para experimentos em Spinner e Biorreator (Bioflo 110).

As células mantidas em nitrogênio líquido foram descongeladas em frascos de cultura celular de 25cm² e mantidas em incubadora úmida a 37°C com concentração de 5% de gás CO₂. Após recuperar sua viabilidade as células foram inoculadas em frasco de cultura celular de 75 cm² na concentração de inóculo de 2x10⁵ cel/mL. Conforme as células foram crescendo e a viabilidade se mantendo, foram então transferidas asépticamente para um frasco Spinner de 500 mL (Wheaton) com 200 mL de meio de cultura e concentração de inóculo de 2x10⁵ cel/ml. O meio foi aerado após 24 h de cultivo através de um sistema de aeração por membranas de silicone adaptado ao frasco. Atingindo a concentração celular adequada e viabilidade acima de 95%, as células então foram inoculadas em um biorreator tipo tanque agitado de 2L (Bioflo 110 - New Brunswick Scientific, NJ, USA) com volume de trabalho de 850mL e 700mL (dependendo da linhagem analisada) e concentração do inóculo também de 2x10⁵ cel/ml. Os experimentos E1, E2, E4, E5, seguiram as etapas até o frasco spinner e os E3 e E6 seguiram até o biorreator.

Ao longo de cada experimento em batelada foram retiradas aproximadamente 12 amostras para determinação de:

- a) concentração celular e viabilidade
- b) aminoácidos livres no meio de cultura
- c) glicose, ácido láctico e amônio no meio de cultura

4.3.4 Tratamento dos resultados

Caracterização do crescimento

O parâmetro utilizado para quantificar o crescimento celular foi a velocidade específica máxima de crescimento μ_{\max} . O valor para cada experimento de cultivo foi calculado a partir da relação linear na região exponencial do gráfico de logaritmo da densidade celular ($\ln C_x$) em função do tempo. Utilizou-se o método de regressão linear para calcular o coeficiente angular representando o μ_{\max} e o erro da regressão como estimativa do erro padrão. Os cálculos foram feitos com o programa Origin[®].

O valor da concentração celular máxima $C_{x,\max}$ foi determinado fazendo a leitura diretamente na curva de concentração celular em função do tempo.

Cálculo da produtividade de AM

A produtividade de cada AM foi calculada pela relação da diferença de concentração final no ponto máximo do gráfico de concentração de produto em função do tempo menos a inicial de AM dividida pelo tempo, assim:

$$\text{Produtividade} = \frac{P_f - P_i}{t_f}$$

Onde:

P_f = Concentração máxima de AM , mg.L^{-1}

P_i = Concentração de AM no momento da inoculação do cultivo, mg.L^{-1}

t_f = tempo para se atingir o valor de P_f partir de P_i , h

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESQUEMA EXPERIMENTAL GERAL DA PESQUISA

Como argumentado anteriormente, o conhecimento da cinética de crescimento celular e metabolismo é muito importante para um melhor entendimento da fisiologia e otimização do processo de cultivo *in vitro* quando se tem como alvo a produção de uma proteína. Para a obtenção de dados cinéticos e metabólicos confiáveis é conveniente levar em consideração que os padrões metabólicos de células de mamíferos são alterados substancialmente quando passam de um tecido de um organismo pluricelular para um dispositivo artificial de cultivo monocelular *in vitro* (Gódia e Cairo, 2006).

Os experimentos ES1, ES2 e ES3 foram realizados com a linhagem ED7 e os experimentos ES5, ES6 e ES7 com a linhagem ED9 em frascos spinner para conhecer em primeira aproximação as características cinéticas e metabólicas dos hibridomas num cultivo em suspensão em dois meios de cultura basais suplementados com 10% v/v de soro fetal bovino. Esses meios foram escolhidos porque as células foram adaptadas a meios parecidos desde a fase de fusão celular para geração dos clones híbridos. O meio que se mostrou mais apropriado para cada linhagem foi utilizado para os cultivos em biorreator Bioflo 110 (EB4 e EB8). A Tabela 5.1 apresenta as condições em que os experimentos foram realizados.

Tabela 5.1: Programação geral dos experimentos de cultivo.

Experimentos	Objetivo	Descrição
ES1	Conhecer características cinéticas e metabólicas e determinar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de AM da linhagem ED7.	Experimento em frasco Spinner de 500mL com 200 mL de volume de trabalho, meio RPMIS com solução Gln = 8mM, temperatura: 37°C, agitação: 75 rpm.
ES2	Conhecer características cinéticas e metabólicas e determinar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de AM da linhagem ED7.	Experimento em frasco Spinner de 500mL com 200 mL de volume de trabalho, meio RPMIS suplementado com Ser, Gln, Met, Lys e Cys, temperatura: 37°C, agitação: 75 rpm.
ES3	Conhecer características cinéticas e metabólicas e determinar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de AM da linhagem ED7.	Experimento em frasco Spinner de 500mL com 200 mL de volume de trabalho, meio MQYS, temperatura: 37°C, agitação: 75 rpm.
EB4	Avaliação da produção de AM da linhagem ED7 em biorreator com o meio que se mostrou mais adequado.	Experimento em biorreator de 2L com 650 mL de volume de trabalho, meio RPMIS suplementado com Ser, Gln, Met, Lys e Cys, temperatura: 37°C, agitação: 100 rpm, oxigênio dissolvido em 40% da saturação com ar..
ES5	Conhecer características cinéticas e metabólicas e determinar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de AM da linhagem ED9.	Experimento em frasco Spinner de 500mL com 200 mL de volume de trabalho, meio RPMIS, temperatura: 37°C, agitação: 75 rpm.
ES6	Conhecer características cinéticas e metabólicas e determinar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de AM da linhagem ED9.	Experimento em frasco Spinner de 500mL com 200 mL de volume de trabalho, meio RPMIS suplementado com Gln, Pro e Cys, temperatura: 37°C, agitação: 75 rpm.
ES7	Conhecer características cinéticas e metabólicas e determinar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de AM da linhagem ED9.	Experimento em frasco Spinner de 500mL com 200 mL de volume de trabalho, meio MQYS, temperatura: 37°C, agitação: 75 rpm.
EB8	Avaliação da produção de AM da linhagem ED9 em biorreator com o meio que se mostrou mais adequado	Experimento em biorreator de 2L com 650 mL de volume de trabalho, meio MQYS, temperatura: 37°C, agitação: 80 rpm, oxigênio dissolvido em 40% da saturação com ar..

5.2 Cultivo em batelada da linhagem ED7 em frasco spinner

Para o conhecimento do crescimento e identificação de nutrientes limitantes foi realizado um cultivo (ES1) em pesquisas que procederam o presente trabalho (Ferreira, 2007). No cultivo utilizou-se o meio RPMIS com uma solução de Glutamina (8 mM) ao invés de Glutamax (GIBCOTM). O resultado está apresentado na Figura 5.1.

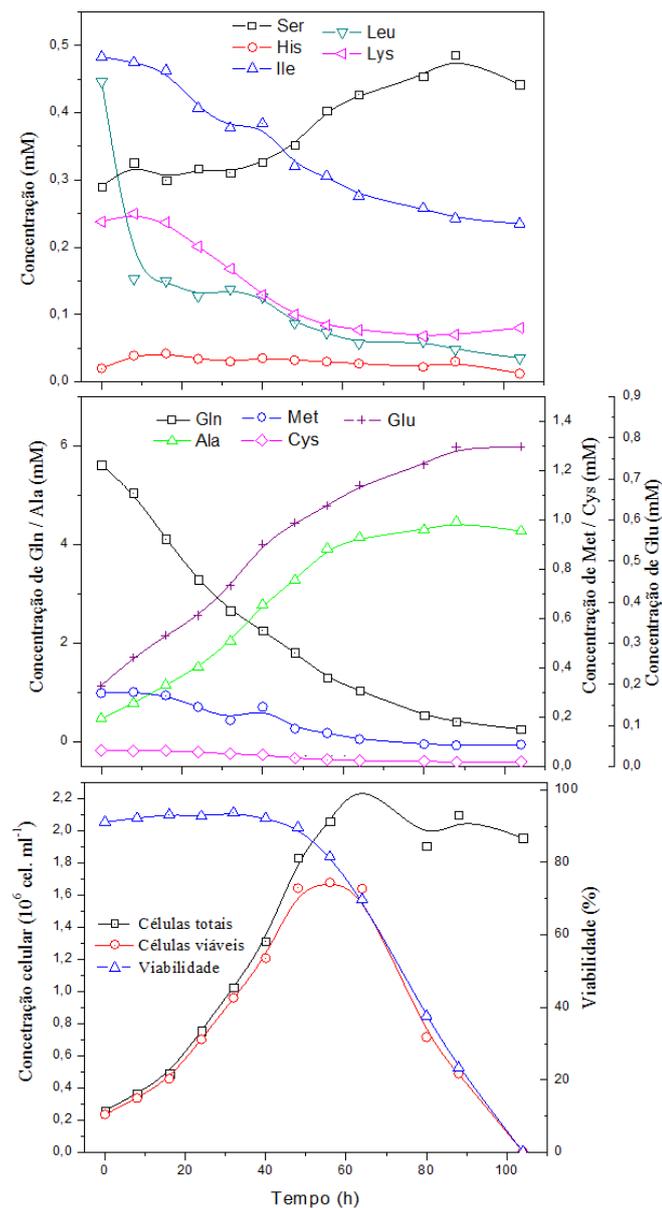


Figura 5.1: Resultados de crescimento celular e aminoácidos mais consumidos e produzidos do experimento realizado em spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm. Adaptado de Ferreira, 2007.

Observa-se pela Figura 5.1 que alguns aminoácidos (AA) foram consumidos rapidamente e praticamente se esgotaram no meio de cultura. Sendo assim, o experimento ES2 foi realizado suplementando-se o meio de cultivo com os aminoácidos consumidos em mais de 90% do valor inicial (Ser, Gln, Met, Lys e Cys).

Por outro lado, no ES3 utilizou-se meio de cultura MQYS. Para poder fazer este experimento foi necessário fazer uma adaptação prévia do hibridoma ED7 a este novo meio. Essa adaptação foi feita partindo-se da linhagem originalmente adaptada ao meio RPMIS. Gradativamente adicionava-se meio MQYS e diminuía-se a concentração de meio

RPMIS, com o objetivo de se manter a viabilidade celular em valores elevados. A Figura 5.2 mostra o histórico da viabilidade celular durante o processo de adaptação.

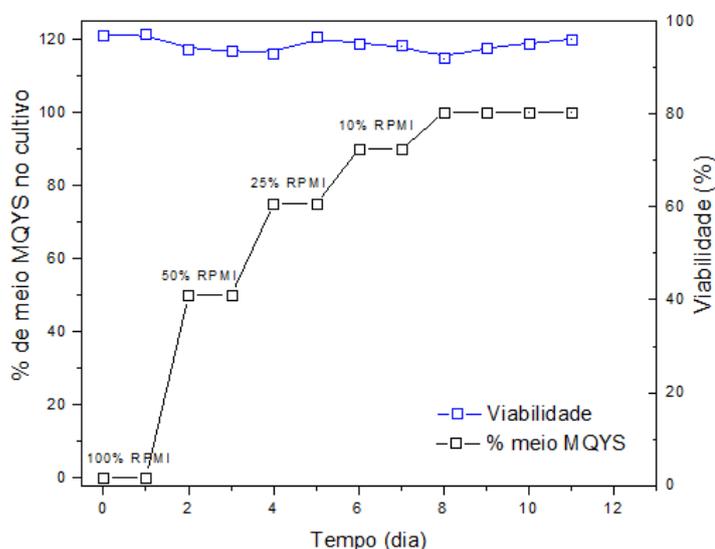


Figura 5.2: Comportamento do hibridoma ED7 ao ser adaptado a concentrações crescentes do meio de cultura MQYS

Observa-se pela Figura 5.2 que durante todo o processo de adaptação os valores de viabilidade celular ficaram acima de 90%. Só após essa etapa, foi realizado o experimento ES3 para a avaliação do comportamento do hibridoma ED7 no meio de cultivo MQYS.

A Figura 5.3 mostra os resultados dos dois experimentos com o hibridoma ED7; no ES2 com o meio RPMIS e no ES3, já adaptado, com o MQYS. Nessa figura são apresentados os dados de crescimento celular, bem como o consumo de glicose, os aminoácidos mais consumidos e produzidos.

Observa-se na Figura 5.3 que nos dois experimentos as células conseguiram crescer com velocidades máximas específicas de crescimento típicas e semelhantes, $\mu_{\text{máx}} = 0,0304 \pm 0,0014 \text{ h}^{-1}$ para ES2 e $\mu_{\text{máx}} = 0,0294 \pm 0,0010 \text{ h}^{-1}$ para ES3, e com viabilidades próximas de 100%. No experimento ES2 a concentração máxima de células viáveis foi de $2,00 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$, enquanto que no ES3 atingiu $1,76 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$. No ES2 o crescimento foi interrompido devido à depleção dos aminoácidos Cys, Met e Gln a partir das 80 horas de cultivo.

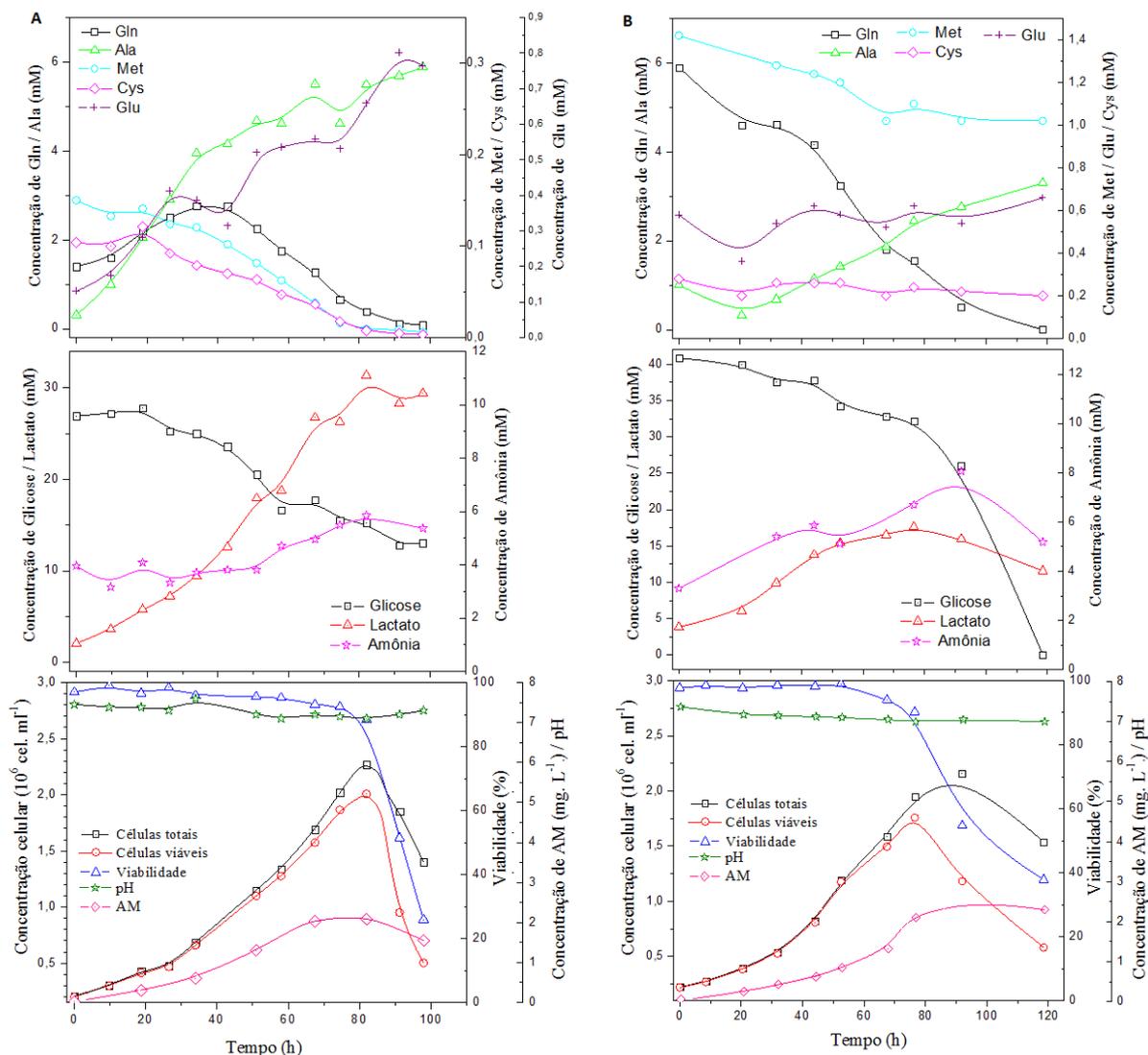


Figura 5.3: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais consumidos e produzidos, pH e concentração de anticorpo monoclonal dos experimentos realizados em spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm. A) ES2 com meio de cultura RPMIS suplementado com 3,525 mg/L de Ser, 2,255 mg/L de Met, 7,7 mg/L de Cys, 3,812 mg/l de Lys e 15 mg/L de Gln e B) ES3 com meio de cultura MQYS.

No caso do ES3, com um meio notoriamente melhor balanceado e com alguns aminoácidos variando pouco (Met e Cys), sendo mostrados apenas para comparação com os do ES2, o crescimento exponencial foi substituído a partir das 75 horas de cultivo por intensa morte celular. A causa disto foi possivelmente a limitação cinética de Gln ao atingir concentrações de aproximadamente 1 mM; seguindo um comportamento semelhante ao observado e caracterizado por Jeong e Wang (1995). Sendo a Gln um importante precursor na síntese de ácidos nucléicos (Butler, 2004), sua escassez exerce uma forte limitação da biossíntese. O aumento da taxa de consumo de glicose que se observa na Figura 5.3 ao

começar a limitação por Gln não deve suprir as necessidades de nitrogênio que estavam sendo preenchidas por esse aminoácido.

O aumento inicial da concentração de Gln no experimento ES2 deve-se à liberação gradual pelo GlutaMAX™ (dipeptídeo de L-Alanina e L-Glutamina) da glutamina pela ação de aminopeptidases provenientes das próprias células. Isto também explica o acúmulo acentuado de Ala no meio de cultura. Somando a Ala produzida pelo GlutaMAX™ com a produzida pela reação de Glu com piruvato comumente presente em células de mamíferos (Gódia e Cairo, 2006) consegue-se justificar a alta produção de Ala no experimento ES2 em comparação com o ES3. O outro aminoácido bastante produzido pelo hibridoma ED7 foi o Glu, assemelhando-se assim ao perfil de produção desses dois aminoácidos do hibridoma KB-26.5 estudado por Sanfeliu et al, 1996.

As concentrações máximas de íon amônio ultrapassaram nos dois experimentos o valor de 5mM que é considerado inibitório de crescimento celular (Newland et al, 1994). No ES3 isto aconteceu mais cedo e com concentrações maiores que o ES2, podendo ter causado inibição do crescimento celular antes da Gln atingir o valor de 1 mM apontado como estequiometricamente limitante por Jeong e Wang (1995). As concentrações máximas de lactato atingidas, 30 mM no ES2 e 17 mM no ES3, não devem ter afetado o crescimento celular uma vez que foram inferiores a 40 mM, valor reconhecido como inibitório em condições de pH razoavelmente controlado (Ozturk et al, 1992). Neste caso o controle foi realizado através do CO₂ da incubadora na faixa de 7.2 – 7.4.

Quanto à produção de anticorpo monoclonal pode-se observar na figura que a produção de anti-A acompanha o crescimento celular nos dois experimentos, tendo seu valor máximo de produtividade de 0,031 mg/L.h em ES3 e 0,027 mg/L.h em ES2.

O cultivo em frasco spinner tem a desvantagem de não ter um controle preciso dos parâmetros de cultura como pH e oxigênio dissolvido, necessários para um melhor entendimento do estado fisiológico da célula para otimização da produção de anticorpos (Kretzmer, 2002). Por essa razão procurou-se um ambiente de cultura que além de ser mais homogêneo e controlado se aproxima da realidade de um processo industrial. Para tal fim utilizou-se o biorreator tipo tanque agitado com o meio de cultivo que deu maior produtividade em frasco spinner (RPMIS).

5.3 Cultivo em batelada da linhagem ED7 em biorreator

Na Figura 5.4 são apresentados os resultados obtidos para o cultivo em biorreator (EB4). O crescimento celular foi melhor que no frasco spinner, uma vez que se atingiu uma concentração celular de $1,80 \times 10^6$ células viáveis/mL. O valor da velocidade máxima específica de crescimento foi $\mu_{\text{máx}} = 0,0329 \text{ h}^{-1}$.

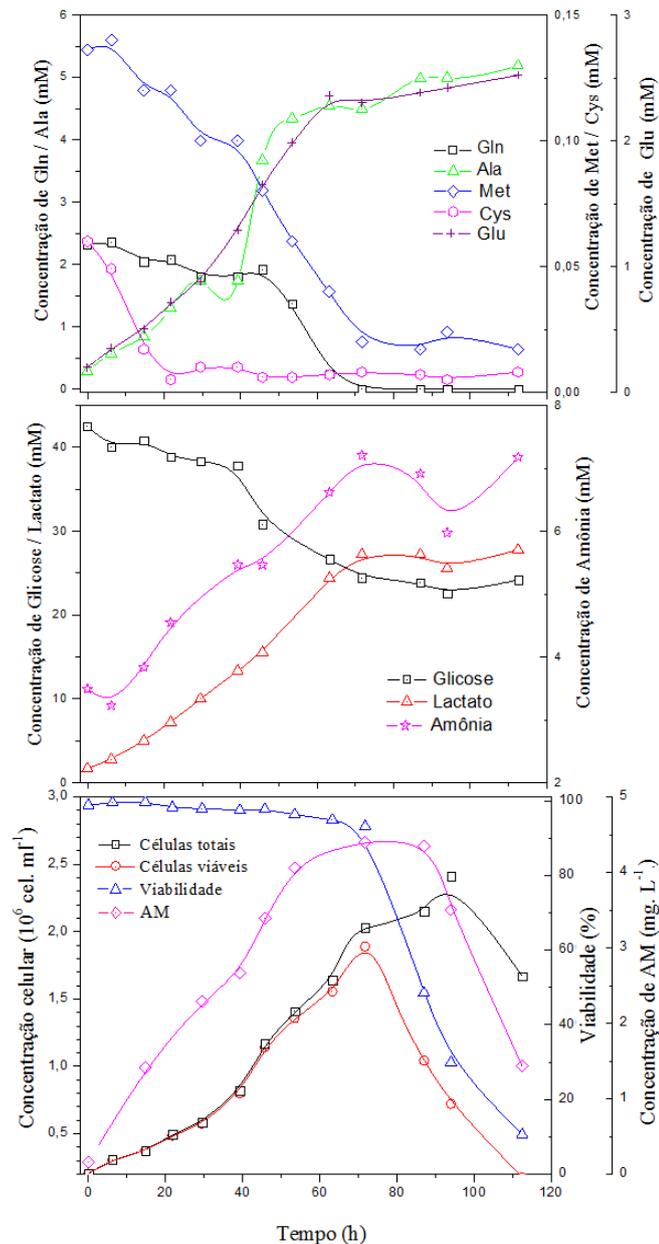


Figura 5.4: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais produzidos e consumidos, concentração de anticorpo monoclonal obtidos no EB4, cultivo em biorreator de 2L com volume de trabalho de 650 ml, a 37°C, agitação de 100 rpm, meio controlado em pH 7,2, com meio RPMIS, suplementado com 3,525 mg/L de Ser, 2,255 mg/L de Met, 7,7 mg/L de Cys, 3,812 mg/L de Lys e 15 mg/L de Gln. O oxigênio dissolvido foi controlado em 40% da saturação com ar

Nota-se pela Figura 5.4 que, por volta de 70 horas de cultivo, a viabilidade caiu drasticamente coincidindo com o esgotamento da Gln, aminoácido essencial para o crescimento celular. Outros aminoácidos, como a Cys e a Met também foram bastante consumidos, os baixos níveis de concentração destes aminoácidos, também devem ter contribuído com a diminuição da viabilidade, uma vez que já foi demonstrado que a privação de qualquer um deles resulta na indução da morte celular por apoptose (Singh et al., 1997). O consumo de glicose se manteve baixo, tendo sobrado uma quantidade apreciável deste substrato no final do experimento. A produção de lactato pela linhagem ED7 em meio RPMIS, à semelhança do cultivo em frasco spinner, não deve ter afetado o crescimento celular, já que, como anteriormente mencionado, a concentração não atingiu valores considerados inibitórios em cultivos com pH controlado (Ozturk et al., 1992).

A produção de anti-A acompanhou o crescimento celular, tendo atingido seu valor máximo de produtividade 0,077 mg/L.h, no final da fase exponencial. A partir de então, a concentração do anticorpo começou a decair, possivelmente pela ação de proteases liberadas no meio pela lise celular. Apesar da suplementação de aminoácidos houve esgotamento de Gln às 70 horas de cultivo, fato que deu origem à interrupção do crescimento celular e da produção de anticorpo monoclonal. A Cys também foi muito consumida, chegando quase a exaustão com 20 horas de cultivo. A partir deste instante, a Cys sendo um aminoácido não essencial, passou a ser suprida pela Met através de reação também encontrada no metabolismo de outros hibridomas (Jo et al., 1990; Sanfeliu, et al., 1996).

A Tabela 5.2 apresenta um resumo dos valores de $\mu_{\text{máx}}$, concentração máxima de células viáveis ($X_{\text{máx}}$) e produtividade encontrados nos experimentos para a linhagem ED7.

Tabela 5.2: Valores de $\mu_{\text{máx}}$, concentração máxima de células viáveis e produtividade encontrados nos experimentos ES2, ES3 e EB4.

Experimentos	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$X_{\text{máx}} (\text{cel/ml})$	Produtividade (mg/L.h)
ES2	$0,0304 \pm 0,0014$	$2,00 \times 10^6$	0,027
ES3	$0,0294 \pm 0,0010$	$1,76 \times 10^6$	0,031
EB4	$0,0329 \pm 0,0011$	$1,80 \times 10^6$	0,077

5.4 Cultivo em batelada da linhagem ED9 em frasco spinner

Da mesma maneira que para a outra linhagem celular, para este clone realizou-se um experimento controle (ES5) para o conhecimento do comportamento celular em cultivos em suspensão. O experimento foi realizado em frasco spinner, utilizando o meio de cultura RPMIS. Os resultados estão apresentados na Figura 5.5.

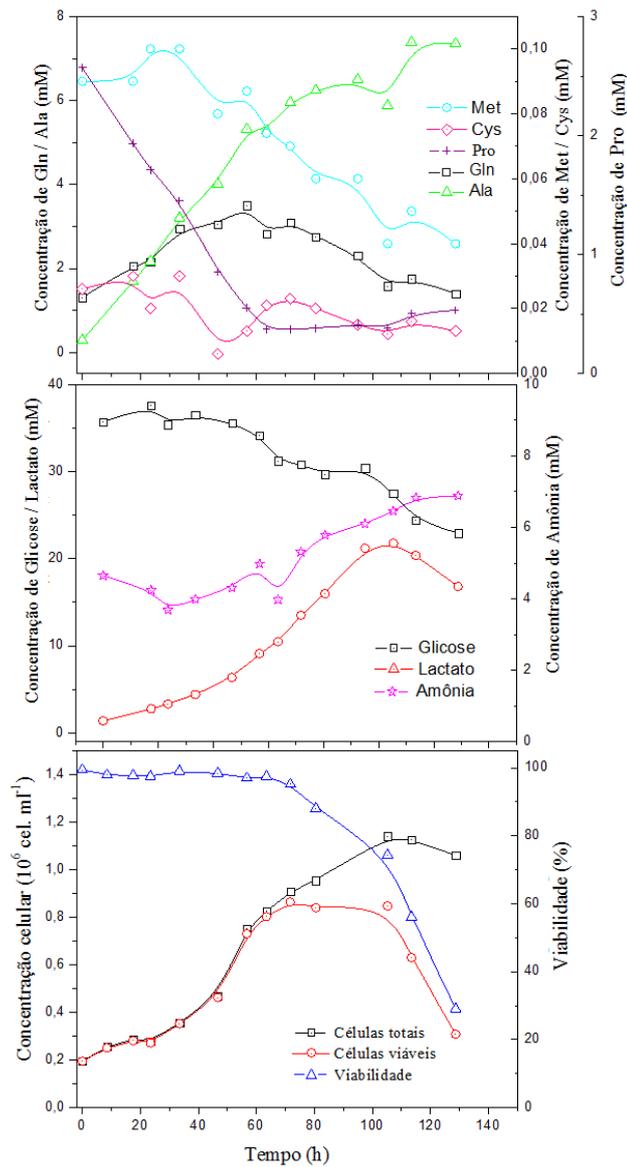


Figura 5.5: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais consumidos e produzidos em ES5, realizado em spinner de 500ml com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm e meio de cultura RPMIS

Como já visto com a outra linhagem, com este clone o meio de cultura também não está balanceado, tendo aminoácidos consumidos rapidamente até quase se esgotarem. Um outro experimento (ES6) foi realizado então suplementando o meio de cultivo com os aminoácidos consumidos mais de 90% (Gln, Pro e Cys).

Já em ES7 utilizou-se meio de cultura MQYS sendo antes necessário fazer uma adaptação do hibridoma ED9 a este meio em concentrações crescentes, da mesma forma como foi feito com a linhagem ED7. A Figura 5.6 mostra o comportamento da viabilidade celular durante o processo de adaptação.

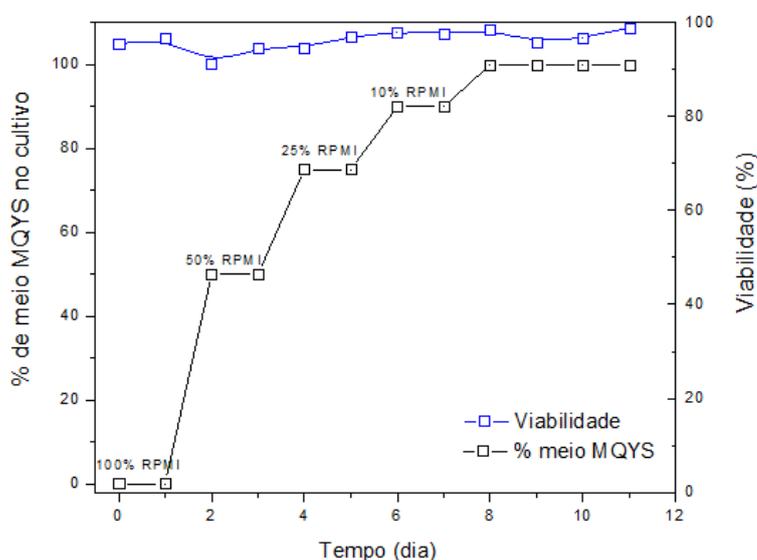


Figura 5.6: Comportamento do hibridoma ED9 ao ser adaptado a concentrações crescentes do meio de cultura MQYS.

Só após a adaptação foi realizado o experimento ES7 para a avaliação do comportamento do hibridoma ED9 no meio de cultivo MQYS. A Figura 5.7 mostra os resultados dos dois experimentos com o hibridoma ED9; no ES6 com o meio RPMIS e no ES7 com o MQYS. Nessa figura são apresentados os dados de crescimento celular, bem como a evolução de glicose, de aminoácidos mais consumidos e produzidos e a produção com o meio RPMIS e com o meio MQYS com o hibridoma ED9 de anti-AB ao longo do cultivo.

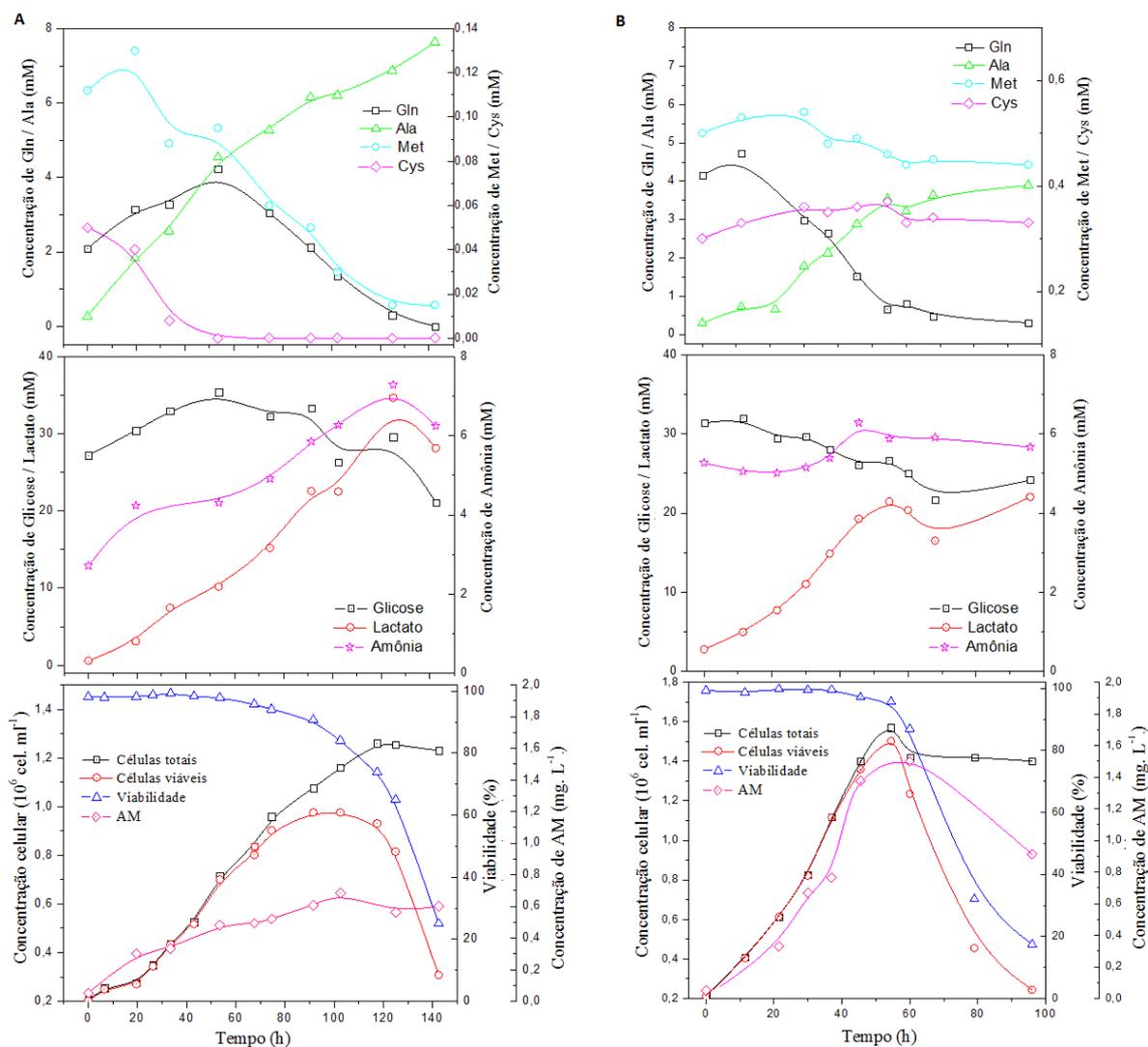


Figura 5.7: Resultados de crescimento celular, glicose, aminoácidos mais consumidos e produzidos e concentração de anticorpo monoclonal dos experimentos feitos em spinner de 500ml com volume de trabalho de 200mL, a temperatura de 37°C, agitação 75rpm. A) ES6 com meio de cultura RPMIS suplementado com 2,575 mg/L de Pro, 7,7 mg/L de Cys e 15 mg/L de Gln e B) ES7 com meio de cultura MQYS.

Os valores de velocidade específica máxima de crescimento celular obtidos foram de $0,0272 \pm 0,0014 \text{ h}^{-1}$ para ES6, enquanto que para o ensaio ES7 foi de $0,0412 \pm 0,0024 \text{ h}^{-1}$ e com viabilidades próximas de 100 %. No experimento ES6 a concentração máxima de células viáveis foi de $0,98 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$, menor que o do ES7 que atingiu $1,50 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$. No ES6 o crescimento foi interrompido devido à escassez da Cys a partir das 60 horas de cultivo. Neste caso a taxa de conversão de Met para Cys não foi suficiente para compensar o alto consumo de Cys para exercer suas duas funções principais na célula, síntese de biomassa e de proteína livre. No caso do ES7, com um meio melhor balanceado, a fase exponencial foi interrompida às 55 horas de cultivo, devido à limitação de

Gln que apresentava níveis bem baixos, de aproximadamente 0,7 mM. Com o hibridoma ED9 não houve aumento da taxa de consumo de glicose que se observou com o ED7 ao começar a limitação por Gln.

O hibridoma ED9 também mostrou um aumento inicial da concentração de Gln no experimento ES6 atribuído à liberação gradual da Gln pelo GlutaMAX™. De forma semelhante ao ED7, o ED9 apresentou um acúmulo acentuado de Ala no meio de cultura como produto da liberação pelo GlutaMAX™ e da síntese pela própria célula. O outro aminoácido bastante produzido pelo hibridoma ED9 foi o Glu, assemelhando-se também ao perfil de produção de aminoácidos do hibridoma KB-26.5 (Sanfeliu et al, 1996).

As concentrações máximas de íon amônio ultrapassaram nos dois experimentos valores de 5mM que são considerados inibitórios de crescimento celular (Newland et al, 1994). No ES6 isto aconteceu com concentrações maiores que o ES7, podendo ter causado em ambos experimentos inibição do crescimento celular antes da Gln atingir o valor de 1 mM apontado como estequiometricamente limitante (Jeong e Wang, 1995). As concentrações máximas de lactato atingidas, 30 mM no ES6 e 22 mM no ES7, não devem ter afetado o crescimento celular uma vez que ficaram distante do valor de 40 mM reconhecido como inibitório (Ozturk et al, 1992) em condições de pH controlado através do CO₂ da incubadora na faixa de 7.2 – 7.4.

No que se refere à produção de anticorpo monoclonal, pode-se observar que a produção de anti-AB acompanha o crescimento celular nos dois experimentos, tendo seu valor máximo de produtividade de 0,008 mg/L.h em ES6 e 0,030 mg/L.h em ES7. Como a produção de anticorpo monoclonal foi 5 vezes maior em ES7 com relação ao ES6, realizou-se um experimento em biorreator, utilizando-se meio de cultivo MQYS.

5.5 Cultivo em batelada da linhagem ED9 em biorreator

Realizou-se um cultivo em biorreator tipo tanque agitado (EB8) com o meio MQYS. Na Figura 5.8 são apresentados os resultados obtidos. O crescimento celular foi 33 % maior que no frasco spinner no ES7, uma vez que se atingiu uma concentração celular de $2,00 \times 10^6$ células viáveis/mL. A velocidade específica máxima de crescimento celular foi de $\mu_{\max} = 0,0373 \pm 0,0019 \text{ h}^{-1}$.

Nota-se pela Figura 5.8 que a partir das 57 horas de cultivo, a viabilidade caiu drasticamente. A morte celular que se observa coincide com o esgotamento da Gln, como já apontado, um aminoácido de crucial importância para o crescimento celular. O consumo de glicose se manteve baixo, tendo sobrado uma quantidade substancial deste substrato no final do experimento. A produção de lactato pela linhagem ED9 em meio MQYS, à semelhança do cultivo em frasco spinner, não deve ter afetado o crescimento celular, já que a concentração não atingiu valor considerado inibitório (40 mM).

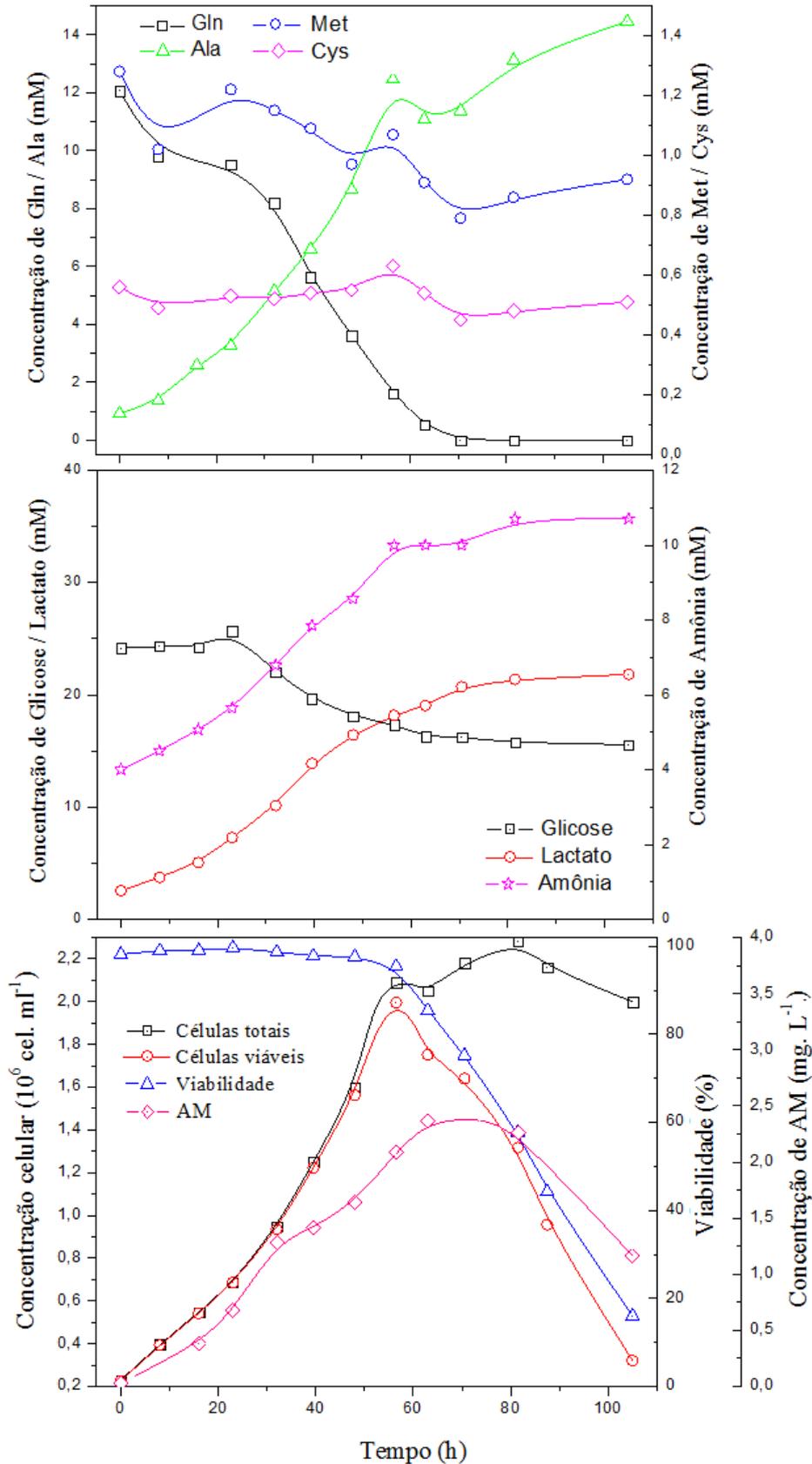


Figura 5.8: Resultados de crescimento celular, glicose e aminoácidos mais consumidos e produzidos e concentração de anticorpo monoclonal anti-AB no experimento EB8, cultivo em biorreator de 2L com volume de trabalho de 650 ml, a 37°C, agitação de 80 rpm, meio MQYS, controlado em pH 7,2 e oxigênio dissolvido controlado em 40% da saturação com ar

A produção de anti-AB pelo hibridoma ED9 acompanhou o crescimento celular, tendo atingido seu valor máximo de produtividade 0,040 mg/L.h. A partir de então, a concentração do anticorpo começou a decair, possivelmente como consequência da ação de proteases liberadas pela lise celular. Apesar da suplementação de aminoácidos houve esgotamento de Gln às 70 horas de cultivo, dando origem à interrupção do crescimento celular e da produção de anticorpo monoclonal anti-AB. Os outros aminoácidos não atingiram níveis limitantes, evidenciando um meio de cultura melhor balanceado que o RPMIS.

O valor obtido para a velocidade específica máxima de crescimento celular foi de $\mu_{\max} = 0,0373 \pm 0,0019 \text{ h}^{-1}$. A concentração máxima de células viáveis chegou a 33% maior que o cultivo no spinner (ES7). O instante em que a concentração de células viáveis começa a decair, coincide com valores de concentração de glutamina causadores de morte celular ($< 1 \text{ mM}$) apontados por Jeong e Wang (1995).

A Tabela 5.3 apresenta um resumo dos valores de μ_{\max} , concentração máxima de células viáveis (X_{\max}) e produtividade encontrados nos experimentos para a linhagem ED9.

Tabela 5.3: Valores de μ_{\max} , concentração máxima de células viáveis e produtividade encontrados nos experimentos ES6, ES7 e EB8.

Experimentos	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	$X_{\max} (\text{cel/ml})$	Produtividade (mg/L.h)
ES6	$0,0272 \pm 0,0014$	$0,98 \times 10^6$	0,008
ES7	$0,0412 \pm 0,0024$	$1,50 \times 10^6$	0,030
EB8	$0,0373 \pm 0,0019$	$2,00 \times 10^6$	0,040

5.6 Testes de hemaglutinação

Para determinar se o anticorpo produzido continuava com sua especificidade e seletividade, foi realizado no laboratório do hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu o teste de hemaglutinação com a determinação do título das imunoglobulinas em amostras retiradas dos experimentos.

Para a linhagem ED7, os resultados mostraram que independente do meio de cultura utilizado, os anticorpos produzidos estão ativos e mantinham sua especificidade com o antígeno eritrocitário testado. Os testes de hemaglutinação tiveram valores de +3 e +4 e o título obtido foi de 1:32. O título foi mantido mesmo depois das amostras ficarem congeladas por mais de 3 meses.

Para a linhagem ED9, os anticorpos analisados também estavam ativos e mantendo sua especificidade contra os antígenos eritrocitrários, com valores de hemaglutinação 4+. O título obtido foi de 1:32.

5.7 Cultivo em batelada da linhagem TAN em spinner

As células foram descongeladas e ativadas em meio RPMIS suplementado com 20% v/v de SFB. Após o descongelamento, visualmente as células apresentavam-se normais e sem contaminações.

Depois de um período de 48h, retirava-se a primeira amostra para conferir quantidade, viabilidade e dar manutenção na cultura. A primeira contagem apresentava-se normal, com viabilidades próximas a 95%. Mas nas próximas amostras retiradas, observava-se que não havia crescimento celular e a viabilidade diminuía com o tempo. A Figura 5.9 apresenta uma das diversas tentativas de ativação da linhagem TAN em frasco T.

Foram realizadas tentativas de suplementar o meio de cultivo com glutamina e glicose, sem sucesso.

Também realizou-se o descongelamento da linhagem utilizando meio RPMI com 90% de SFB, mas as células não conseguiam se manter. O uso de outros meios de cultura também não foi eficiente para se conseguir um crescimento da cultura.

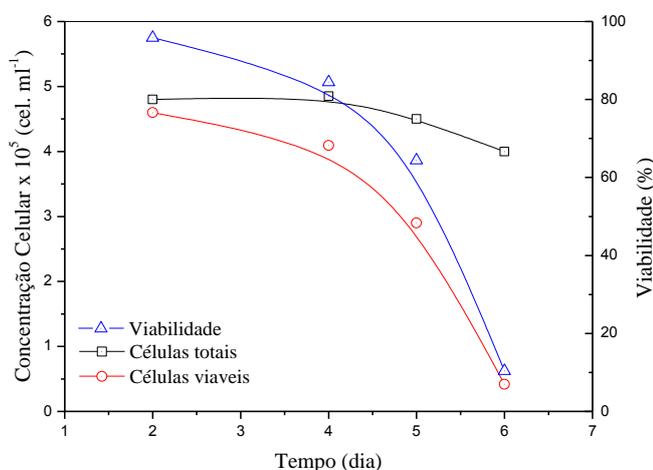


Figura 5.9: Resultados de concentração celular total e viável e viabilidade para a ativação após descongelamento da linhagem TAN em meio de cultura RPMI com adição de 20% de SFB em cultura em frasco T.

5.8 Sobre a produção de anticorpos monoclonais pelos hibridomas

Fazendo um resumo dos resultados de produção de AMs pelos hibridomas ED7 e ED9 nos 6 experimentos realizados pode-se perceber através da Figura 5.10 que os dois experimentos em biorreator permitiram a obtenção dos maiores valores de concentração e produtividade de anti-A pelo hibridoma ED7 e anti-AB pelo hibridoma ED9. Podem-se apontar como fatores mais determinantes na obtenção desse resultado a suplementação nutricional e as condições de processamento mais controladas, especialmente pH e oxigênio dissolvido. O aumento da produtividade de anti-A no biorreator com relação ao spinner foi de 2,4 vezes. No caso do anti-AB esse aumento foi de 5 vezes com relação ao ES6 e 1,3 vezes maior que ES7.

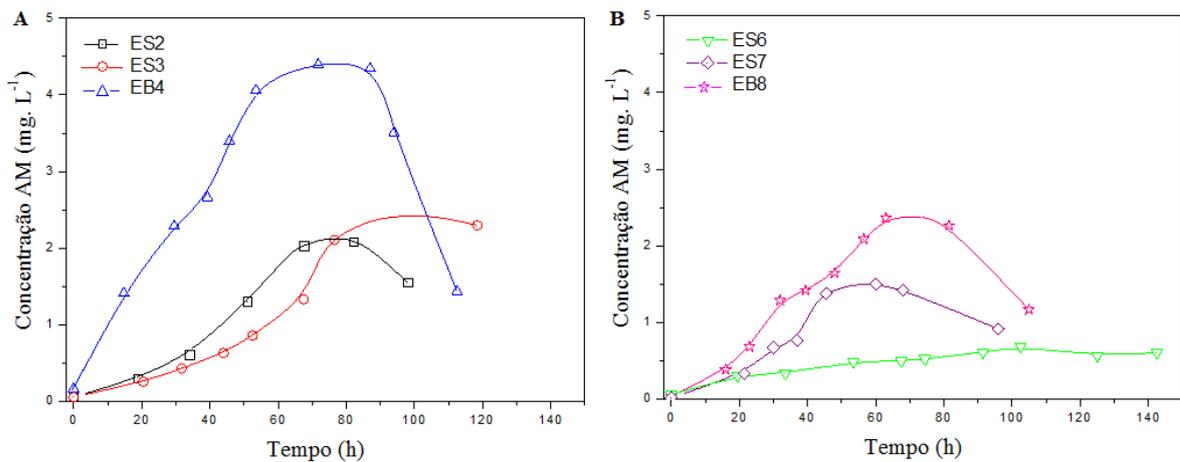


Figura 5.10: Resultados de produção de anticorpos monoclonais produzidos nos 6 experimentos de cultivo realizados neste trabalho com os meios de cultivo suplementados RPMIS e MQYS. A) AM anti-A produzido pelo hibridoma ED7 e B) AM anti-AB produzido pelo hibridoma ED9.

5.9 Análise geral dos resultados deste trabalho

Fazendo uma análise geral dos resultados pode-se dizer que os hibridomas utilizados no presente estudo e num estudo precedente (Ferreira, 2007), a longo de quase 6 anos se mostraram bastante estáveis, com pouca variação no crescimento e no metabolismo no meio RPMIS. A terceira linhagem de hibridoma estudada, produtora de anti-AB, foi descartada por causa da instabilidade apresentada depois de 3 anos de ter iniciado este trabalho devido à perda de capacidade de crescimento no mesmo meio de cultivo como foi mostrado no item 5.7.

Os resultados obtidos neste trabalho com os hibridomas ED7 e ED9 permitem perceber que a estratégia de balanceamento nutricional dos meios de cultura, pode levar a uma melhora dos cultivos em batelada no que diz respeito a capacidade de crescimento das células e a síntese dos anticorpos anti-A e anti-AB. Porém, é importante lembrar que o aumento da concentração de Gln em presença de altas concentrações de glicose, acabam causando desregulação do metabolismo de células de mamíferos (Gódia e Cairo, 2006), como já comprovado por vários pesquisadores (Miller et al, 1988; Glacken et al, 1986; Butler e Spier, 1984; Jeong e Wang, 1995). Essa desregulação é caracterizada por uma exagerada produção de lactato e amônio em adição a um ineficiente uso dessas fontes de carbono e energia.

Uma solução conveniente a ser adotada para amenizar esse problema com ED7 e ED9 será mediante o uso da forma de cultivo em biorreator de batelada alimentada. Neste sistema os nutrientes limitantes como Gln e a glicose serão adicionadas de forma modulada durante o curso do cultivo para manter suas concentrações baixas e, por conseqüência, um metabolismo eficiente com alto rendimento celular, baixa produção de metabólitos tóxicos (lactato e amônia) e maior concentração de anticorpo monoclonal.

Finalmente, uma continuação do estudo aqui iniciado deverá passar pela avaliação de meios de cultura livres de soro, não só para verificar se a relação custo-benefício dos dois hibridomas é suficientemente atrativa, como também para poder contar com a anuência de órgãos reguladores para licenciar o uso de uma tecnologia de produção mais confiável em termos de biossegurança. Testes preliminares realizados em nossos laboratórios com o meio BD-Serum Free mostraram uma adaptação bastante difícil dos hibridomas. Estudos mais aprofundados serão necessários para se obter resultados mais conclusivos.

6 CONCLUSÕES

1. As duas linhagens de hibridomas ED7 e ED9 se mostraram bastante estáveis no que se refere as características metabólicas e de crescimento celular ao longo da execução da pesquisa. Por outro lado, a linhagem TAN perdeu totalmente sua capacidade de crescimento após 3 anos de armazenamento em nitrogênio líquido, fato que impossibilitou uma análise mais completa de seu potencial para produção de AM como foi feita para as outras duas linhagens.
2. De forma geral os resultados obtidos mostram que os meios básicos RPMIS e MQYS, ambos contendo 10% v/v de soro fetal bovino, precisam de suplementação de alguns aminoácidos para atender as demandas nutricionais dos dois hibridomas de forma mais balanceada. O meio MQYS precisou de menor suplementação por ser um meio desenhado com uma formulação mais específica para hibridomas.
3. Para a linhagem ED7, o cultivo em frasco spinner apresentou uma produtividade 12% maior de anti-A utilizando o meio MQYS se comparado ao meio RPMIS, apesar de ter atingido 14% a menos de células viáveis. Por outro lado, o cultivo numa escala maior em biorreator, com as condições de cultivo melhor controladas, alcançou-se uma produtividade 2,4 vezes maior que o cultivo em spinner utilizando o meio RPMIS.
4. Já para a linhagem ED9, o uso do meio MQYS possibilitou uma concentração de células viáveis 50% maior e uma produtividade de anti-AB 5 vezes maior que a do RPMIS em cultivos em frascos spinner. Para o cultivo em biorreator utilizando o meio MQYS, obteve-se 33% mais células viáveis e uma produtividade de anti-AB 1,3 vezes maior que no frasco spinner.
5. As suplementações com aminoácidos, apesar de terem mostrado melhoras no crescimento celular e na produção de AMs nos cultivos em batelada analisados nesta pesquisa, colocaram em evidência uma limitação desse sistema de cultivo, a qual tem sido bastante debatida na bibliografia especializada sobre tecnologia de cultivo de hibridomas. Essa

limitação, caracterizada pela desregulação do metabolismo dos hibridomas quando em presença de altas concentrações de glicose e glutamina se reflete em baixo crescimento e baixa síntese de AM, deverá ser contornada num sistema de cultivo de batelada alimentada.

6. Ambas linhagens de hibridomas, ED7 e ED9, produziram anticorpos ativos sem perder a especificidade à seus respectivos antígenos.

7 RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1. Testar a adaptação dos hibridomas ED7 e ED9 a meios livres de soro e de componente animal visando maior crescimento celular, maior produção de Mas e maior aceitabilidade dos órgãos reguladores.
2. Desenvolver estratégias de cultivo em biorreator de tanque agitado funcionando em regime de batelada alimentada e posteriormente em sistemas de perfusão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, Elsevier, 5ª Edição, 2005.
- Adams, G.P.; Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 1147–57, 2005.
- Altamirano, C. et al. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. **Biotechnology Progress**, v. 16, p.69-75, 2000.
- Arathoon, W. R.; Birch, J. R. Large scale cell culture in biotechnology. **Science**, v.232, p.1390-1395, 1986.
- Atanassov, C.L.; Seiler, N.; Rebel, G. Reduction of ammonia formation in cell cultures by L-alanyl-L-glutamine requires optimization of the dipeptide concentration. **Journal of Biotechnology**, v.62, p. 159–162, 1998.
- Bai, Y. et al. Role of iron and sodium citrate in animal protein-free CHO cell culture medium on cell growth and monoclonal antibody production. **Biotechnology Progress** v. 27, 209–219, 2011.
- Bailey, J.E.; Ollis, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. Local: Mc-Graw-Hill International Editions, 1986.
- Ballow, M. “Ximab this and – zumab that! Has the magic bullet arrived in the new millennium of medicine and science? **Journal of Allergy Clinical and Immunology**., v.116, p.738-743, 2005.
- Benjamini, E.; Coico, R.; Sunshine, G. **Imunologia**, 4ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 2002.
- Birch, J.R.; Boraston, R.; Wood, L. Bulk production of monoclonal antibodies in fermenters. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.162–166, 1985.
- Birch, J. R. et al. Antibody production with airlift fermenters. In: **Large Scale Cell Culture Technology** (K. Lyderson, ed.) K. Hanser, 1987.
- Birch, J. R.; Racher, A. J. Antibody production. **Advanced drug delivery reviews**, v.58, p.671-685, 2006.
- Blanch, H.W.; Clark, D. S. **Biochemical Engineering**; Marcel Dekker: New York, N.Y., 1996.
- Burgener, A.; Butler, M. **Medium development**. In: Ozturk, S. S. and Wu, W. S. Eds. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York, CRC Press, 2006.
- Butler, M.; Spier, R. M. The effects of glutamine utilization and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier culture. **Journal of Biotechnology**, v.1, p.187-196, 1984.

Butler, M. **Animal cell culture and technology**. 2nd ed. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2004.

Catty, D.; Raykundalia, C. **Immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunostaining**, In: Catty, D. *Antibodies: a practical approach*. Washington: IRL Press, 1988: v.1, cap6, p. 137-67.

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

Capstick, P.B. et al. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to virus of foot-and-mouth disease. **Nature**, v.195, p. 1163–1164, 1962.

Chiarella, P.; Fazio, V. M. Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high throughput production. *Biotechnol. Lett.*, 30: 1303-1310, 2008.

Cherlet, M.; Marc, A. Stimulation of monoclonal antibody production of hybridoma cells by butyrate: evaluation of a feeding strategy and characterization of cell behaviour. **Cytotechnology**, v.32, p. 17-29, 2000.

Christie, A.; Butler, M. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. **Journal of Biotechnology**, v.37, p.277-290, 1994.

Chisti, Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. **TIBTECH**, v.18, p.420-432, 2000.

Chisti, Y. Hydrodynamic damage to animal cells. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.21, p.67-110, 2001.

Chon, J. H.; Zarbis-Papastoitsis, G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. **New biotechnology**, v.28, p.458-463, 2011.

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.

Cohen, S.A.; Meys, M.; Tarvin, T.L. **Pico-Tag advanced methods manual**. Bedford: Millipore, 1989.

Cruz, H.J. et al. Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures. **Journal of Biotechnology**, v.80, p. 109-118, 2000.

Dempsey, J. et al. Improved fermentation processes for NS0 cell lines expressing human antibodies and glutamine synthetase. **Biotechnology Progress**, v. 19, p.175-178, 2003.

Doran P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, London, 1995.

Ducommun, P. et al. A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures. **Journal of Biotechnology**, v.78, p. 139-147, 2000.

Eagle, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, p.501–504, 1955.

Elvin, J.G.; et al., Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. **International Journal of Pharmaceutics** (2012), doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.039.

Feng, Q. et al. Application of "oxygen uptake rate-amino acids" associated mode in controlled-fed perfusion culture. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 422-430, 2006.

Feng, L. et al. A. Cell culture processes for antibody production. **MABS**, v.2(5), p.466-479, 2010.

Ferreira, D. Caracterização metabólica e cinética do cultivo de três hibridomas para produção de imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários para uso hemoterápico. 2007. 103 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica)** – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

Finter, N.B. et al. **Mass mammalian cell culture**. Biotechnology of mammalian cells. Japanese Science Society Press, Tokyo/Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 139–146, 1987.

Fleischaker, R.J. ; Sinskey, A.J. Oxygen demand and supply in cell culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 193–197, 1981.

Freshney, R. I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

Freshney, R. I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

Gawlitsek, M.; Valley, U.; Wagner, R. Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.57, p.518–528, 1998.

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.

Gòdia, F.; Cairó, J. J. **Cell metabolism**. In: Ozturk, S. S. and Wu, W. S. Eds. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York, CRC Press, 2006.

- Gong, X. et al. Fed-batch culture optimization of a growth-associated hybridoma cell line in chemically defined protein-free media. **Cytotechnology**, v.52, p.25-38, 2006.
- Goochee, C.F.; Monica, T. Environmental effects on protein glycosylation. **Bio-Technology**, v.8, p. 421-427, 1990.
- Griffiths, J.B. Animal cell products, overview. In: SPIER, R.E. (Ed.) **Encyclopedia of cell technology**, New York: John Willey & Sons, 2000. v. 1, p.71-76.
- Hansen, H.A.; Emborg, C. Influence of ammonium on growth, metabolism and productivity of a continuous suspension Chinese hamster ovary cell culture. **Biotechnology Progress**, v.10, p121-124, 1994.
- Hanson, M.A. et al. Comparisons of optical pH and dissolved oxygen sensors with traditional electrochemical probes during mammalian cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, p.833–841, 2007.
- Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.4, p.140-143, 1907.
- Hassel, T.; Butler, M. Adaptation to non-ammoniogenic medium and selective substrate feeding lead to enhanced yields in animal cell cultures. **Journal of Cell Science**. v. 96, p.501-508, 1999.
- Hendriksen, C.F.M.; Leeuw, W. Producton of monoclonal antibodies by the ascites method in laboratory animals. **Research in Immunology**., v. 149, p. 535-542, 1998.
- Hu, W. S et al. Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. **Development in Biological Standardization**, v. 66, p. 279-290, 1987.
- Jain, E.; Kumar, A. Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.46–72, 2008.
- Jang, J.D.; Barford, J.P. Effect of feed rate on growth rate and antibody production in the fed-batch culture of murine hybridoma cells. **Cytotechnology**, v. 32, p. 229–242, 2000.
- Jeong, YH.; 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.
- Kioukia, N. et al. Influence of agitation and sparging on the growth rate and infection of insect cells in bioreactors and a comparison with hybridoma culture. **Biotechnology Progress** v. 12, p. 779-785,1996.
- Köhler, G.; Milstein, C. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p.495–497, 1975.

Kozlowski, S.; Swann, P.. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, p. 707– 722, 2006.

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

Lebherz, W. et al. Production of monoclonal antibodies by large scale submerged hybridoma culture. *In vitro* , v.21: 16A, 1985.

Lee, J.-H. et al. Optimization of feed rate profile for the monoclonal antibody production. **Bioprocess Engineering**, v.20, p.137-146, 1999.

Legazpi, L. et al.. M.. Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: Substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal**, v.26, p.22–130, 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.

Low, D. Future of antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v.848, p. 48-63, 2007.

Maggon, K.; Knol Publishing Guild (KPG). Global Monoclonal Antibodies Market Review 2008 (World Top Ten mAbs):World Best Selling Top Ten Monoclonal Antibodies, Leading Companies, Market Trends [internet]. Disponível em < <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/global-monoclonal-antibodies-market/3fy5eowy8suq3/11>>. Acesso em 14 ago 2009.

Maggon, K.; Guild (KPG), Knol Publishing. Top Ten Monoclonal Antibodies 2010:Global Market Analysis & Blockbuster mabs [Internet]. Disponível em < <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/top-ten-monoclonal-antibodies-2010/3fy5eowy8suq3/143>>.

Matsuno, T.; Satoh, T.; Suzuki, H. Prominent glutamine oxidation activity in mitochondria of avian transplantable hepatoma induced by MC-29 virus. **Journal of Cellular Physiology**, v. 128, p. 397-401, 1986.

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.

Mel, M. et al. Monoclonal antibody production: viability improvement of RC1 hybridoma cell in different types of bioreactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1923-1927, 2008.

Messeter, L. et al. Mouse monoclonal-antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities some superior to human polyclonal ABO reagents. **Vox Sanguinis**, v.46, p. 185-194, 1984.

Michaels, J. D.; Mallik, A. K.; Papoutsakis, E. T. Spargin and agitation-induced injury of cultured animal cells: do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? **Biotechnology and Bioengineering**, v.51 p.399-409, 1996.

Miller, W.M.; Wilke, C.R.; Blanch, H.W. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *Journal of Cellular Physiology*, v.132, p. 524–530, 1987.

Miller, W.M.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. A kinetic analysis of hibridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 67, p. 853-871, 1988.

Miller, W.M.; Wilke, C.R.; Blanch, H.W. The transient responses of hibridoma cells to nutrient addition in continuous culture: II. Glutamine pulse and step changes. *Biotechnology and Bioengineering*, v.33, p.487-499, 1989.

Mizrahi, A. Oxygen in human lymphoblastoid cell line cultures and effect of polymers in agitated and aerated cultures. **In: Proceedings of the 5th Meeting of the ESACT**, Copenhagen, Denmark. Karger, Basel, pp. 93–102, 1982.

Moraes, A.M; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ed, São Paulo, Roca, 2007.

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

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

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. Effect of medium osmolarity on hibridoma growth, metabolism and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, v.37, p. 989-993, 1991.

Ozturk, S.S.; Riley, M.R.; Palsson, B.O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, p.418–431, 1992.

Ozturk, S.S.; Wu, W. S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York, CRC Press, 2006.

Patel, S.D. et al. The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell culture. *Biotechnology Progress*, v. 16, p. 885-892, 2000.

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

Perani, A et al. Variable functions of bcl-2 in mediating bioreactor stress-induced apoptosis in hybridoma cells. *Cytotechnology*, v.28, p. 177–188, 1998.

Pickering, L., 2011. Opportunities for Monoclonal Antibodies: Where Companies are Spending Their Antibody Dollars. **Decision Resources**, Burlington.

Pucca, M.B. et al. Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 47, p.31-39, 2011.

Reichert, J.; Pavlou, A. Monoclonal antibodies market. **Nature reviews**, v.3, p. 383-384, 2004.

Reitzer, L.J.; Wice, B.M.; Kennell, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major source for cultured HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.254, p. 2669-2676, 1979.

Reuveny, S. et al. Production of monoclonal antibodies in culture. **Developmental Biology Standard** 60: 185, 1985.

Rodrigues, M.T.A. et al. Glucose uptake rate as a tool to estimate hybridoma growth in a packed bed bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v.21, p.543-546, 1999.

Rodrigues, M.E. et al. Technological progresses in monoclonal antibody production systems. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 332-351, 2010.

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, p. 345-349, 1997.

Ruffieux, P.A.; Stockar U.V.; Marison I.W. Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures. **Journal of Biotechnology**, v.63, p. 85–95, 1998.

Saleem, M., Kamal, M. Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application. **African Journal of Biotechnology**. V.7(8), p. 923-925, 2008.

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. et al. Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. **Enzyme and Microbial technology**, v. 17, p. 839-847, 1995.

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.

Shibuya, K; Haga, R.; Namba, M. A serum substitute for fed-batch culturing of hibridoma cells. **Cytotechnology**, v. 57, p. 187-197, 2008.

Shukla, A. A.; Thommes, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. **Trends in biotechnology**, v.28, p.253-261, 2010.

Simpson, N.H.; Milner, A.E.; Al-Rubeai, M. Prevention of hybridoma cell death by bcl-2 during sub-optimal culture conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, p.1–16, 1997.

Simpson et al. In hibridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, wich is suppressed by the expression of the blc-2 gene. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p.90-98, 1998.

Singh, R.P. et al. Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 720–726, 1994.

Singh, R.P. et al. Essential amino acid deprivation of hybridoma cells results in the induction of high levels of apoptosis, which is suppressed by bcl-2 over-expression. **Genetic engineer and biotechnologist**, v. 17, p. 121-124, 1997.

Spier, R.E., Griffiths, B. An examination of the data and concepts germane to the oxygenation of cultured animal cells. **In: Proceedings of the 5th Meeting of ESACT, Copenhagen, Denmark. Karger, Basel**, p. 81–92, 1982.

Stoll, T.S. et al. Effects of culture conditions on the production and quality of monoclonal IgA. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 203-211, 1997.

Tang, Y.J.; Ohashi, R.; Hamel, J.F.P. Perfusion culture of hybridoma cells for hyperproduction of IgG(2a) monoclonal antibody in a wave bioreactor-perfusion culture system. **Biotechnology Progress**. v. 23, p. 255-264, 2007.

Takagi, K. et al. Expression of recombinant antibody against cancer-especific carbohydrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.79, p. 405-409, 1995.

Wang, D. et al. The bioreactor: a powerful tool for large-scale cultivation of animal cells. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.6, p.1-7, 2005.

William, M. M.; Charles, R. W.; Harvey, W. B. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. **Journal of Cellullar Physiology**, v. 132, p. 524-530, 1987.

Wu, T.T; Kabat, E.A. An analysis of sequences of variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implication for antibody complementarity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, p. 211-250, 1970.

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

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.

Yamada, K. et al. Relationship between oxygen consumption rate and cellular activity of mammalian cells cultured in serum-free media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p.759–762, 1990.

Yang, M.; Butler, M. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosilation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.370-380, 2000.

Yeo, J.H.M. et al. Glutamine or glucose starvation in hybridoma cultures induces death receptor and mitochondrial apoptotic pathways. **Biotechnology Letters**, v.28, p. 1445-1452, 2006.

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.; Rehm, J.; Hu, W.S. High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 579-587, 1995.

ANEXO A

Tabelas A.1 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, pH, carboidratos e aminoácidos do experimento ES1 produzido com a linhagem ED7 183 A12 em frasco spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL à temperatura de 37°C, agitação de 75 rpm, meio de cultura RPMIS. Adaptado de Ferreira, 2007.

A – Crescimento celular

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	pH
0	2,59E+05	91,13	7,36
8	3,66E+05	92,21	7,25
16	4,91E+05	93,20	7,23
24	7,58E+05	92,74	7,05
32	1,03E+06	93,72	7,18
40	1,31E+06	92,14	6,70
48	1,83E+06	89,67	6,50
56	2,05E+06	81,52	6,59
64	2,35E+06	69,79	6,47
80	1,90E+06	37,63	6,28
88	2,10E+06	23,35	6,45
104	1,95E+06	0,19	6,84

B – Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (horas)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Glu (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
0	5,624	0,469	0,298	0,064	0,197	29,31	2,97	7,37
8	5,051	0,785	0,302	0,064	0,265	28,25	5,23	7,51
16	4,126	1,149	0,289	0,065	0,318	26,2	8,8	7,76
24	3,297	1,512	0,242	0,059	0,367	24,07	12,7	8
32	2,665	2,041	0,188	0,052	0,44	20,68	18,33	8,43
40	2,263	2,78	0,242	0,047	0,541	16,89	24,62	8,62
48	1,814	3,278	0,154	0,034	0,593	13,93	27,3	9,02
56	1,301	3,919	0,136	0,028	0,634	11,57	27,82	9,36
64	1,047	4,144	0,111	0,23	0,684	9,31	27,6	9,79
80	0,542	4,299	0,091	0,021	0,735	4,8	26,27	10,79
88	0,412	4,464	0,086	0,018	0,777	2,05	25,75	11,28
104	0,263	4,271	0,089	0,02	0,777	0,95	22,42	12,15

Tabelas A.2 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, pH, AM, carboidratos e aminoácidos do experimento ES2 produzido em frasco spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL à temperatura de 37°C, agitação de 75 rpm, meio de cultura RPMIS suplementado com Ser, Met, Cys, Lys, Gln.

A – Crescimento celular e produção de AM anti-A

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	pH	AM (mg/L)
0	2,06E+05	97,00	7,45	0,021
9,75	3,02E+05	99,07	7,38	--
18,75	4,29E+05	96,60	7,38	0,30
26,50	4,75E+05	98,42	7,30	--
34,00	6,88E+05	95,93	7,60	0,61
51,00	1,15E+06	95,56	7,20	1,30
58,00	1,34E+06	95,24	7,10	--
67,50	1,69E+06	93,13	7,20	2,03
74,50	2,02E+06	92,38	7,15	--
82,00	2,27E+06	88,39	7,10	2,09
91,25	1,85E+06	51,45	7,20	--
98,00	1,40E+06	25,91	7,30	1,55

B – Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (horas)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Glu (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônia (mM)
0	1,40	0,31	0,15	0,10	0,13	26,94	2,05	3,96
9,75	1,59	0,99	0,13	0,10	0,18	27,22	3,61	3,16
18,75	2,20	2,05	0,14	0,12	0,28	27,78	5,77	4,09
26,50	2,50	2,90	0,12	0,09	0,41	25,28	7,22	3,33
34,00	2,77	3,95	0,12	0,08	0,39	25,00	9,44	3,72
42,75	2,75	4,15	0,10	0,07	0,31	23,61	12,62	3,81
51,00	2,25	4,68	0,08	0,06	0,52	20,56	17,95	3,81
58,00	1,75	4,61	0,06	0,05	0,54	16,67	18,77	4,72
67,50	1,27	5,50	0,04	0,04	0,56	17,78	26,78	4,96
74,50	0,66	4,62	0,02	0,02	0,53	15,56	26,30	5,49
82,00	0,38	5,49	0,01	0,01	0,66	15,28	31,36	5,84
91,25	0,11	5,69	0,01	0,00	0,80	12,78	28,31	--
98,00	0,08	5,89	0,01	0,00	0,76	13,06	29,42	5,36

Tabelas A.3 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, AM, carboidratos e aminoácidos do experimento ES3 produzido com a linhagem ED7 183 A12 em frasco spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL à temperatura de 37°C, agitação de 75 rpm, meio de cultura MQYS.

A – Crescimento celular e produção de AM anti-A

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	pH	AM (mg/L)
0	2,25E+05	97,77	7,37	0,054
8,50	2,74E+05	98,47	--	--
20,50	3,92E+05	97,70	7,17	0,25
31,75	5,35E+05	98,60	7,15	0,42
44,00	8,23E+05	98,27	7,12	0,63
52,50	1,19E+06	98,95	7,10	0,85
67,50	1,59E+06	94,01	7,05	1,33
76,50	1,95E+06	90,21	7,00	2,11
92,00	2,16E+06	54,68	7,05	--
118,50	1,54E+06	37,78	7,00	2,30

B – Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (s)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Glu (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônio (mM)
0	5,90	1,00	1,42	0,28	0,58	40,83	3,85	3,29
20,50	4,60	0,32	--	0,20	0,36	40,00	6,06	--
31,75	4,62	0,68	1,28	0,26	0,54	37,50	9,91	5,39
44,00	4,16	1,14	1,24	0,26	0,62	37,78	13,77	5,86
52,50	3,24	1,42	1,20	0,26	0,58	34,17	15,42	5,12
67,50	1,80	1,86	1,02	0,20	0,52	32,78	16,52	--
76,50	1,56	2,44	1,10	0,24	0,62	32,22	17,62	6,69
92,00	0,52	2,76	1,02	0,22	0,54	26,11	15,97	8,05
118,50	0,00	3,30	1,02	0,20	0,66	0,00	11,56	5,17

Tabelas A.4 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, AM, carboidratos e aminoácidos do experimento EB4 produzido com a linhagem ED7 183 A12 em biorreator de 2L com volume de trabalho de 850 mL à 37°C, agitação de 100 rpm, meio de cultura RPMIS, oxigênio dissolvido em 40% da saturação com ar, suplementado com 3,525 mg/L de Ser, 2,255 mg/L de Met, 7,700 mg/L de Cys, 3,812 mg/L de Lys, 15 mg/L de Gln.

Crescimento celular e produção de AM anti-A

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	IgG (mg/L)
0	2,06E+05	98,78	0,15
6,25	3,08E+05	99,49	--
14,75	3,73E+05	99,61	1,40
21,75	4,95E+05	98,14	--
29,50	5,87E+05	97,82	2,28
39,25	8,21E+05	97,44	2,66
45,75	1,17E+06	97,65	3,39
53,50	1,41E+06	96,28	4,06
63,25	1,64E+06	94,86	--
71,75	2,03E+06	93,10	4,39
87,00	2,15E+06	48,53	4,34
94,00	2,41E+06	29,95	3,51
112,50	1,67E+06	10,61	1,43

Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (horas)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Glu (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônio (mM)
0	2,32	0,28	0,14	0,06	0,20	42,50	1,67	3,49
6,25	2,36	0,57	0,14	0,05	0,35	40,00	2,78	3,23
14,75	2,04	0,84	0,12	0,02	0,50	40,83	5,00	3,83
21,75	2,08	1,30	0,12	0,01	0,71	38,89	7,22	4,55
29,50	1,81	1,73	0,10	0,01	0,88	38,33	9,99	3,40
39,25	1,81	1,73	0,10	0,01	1,29	37,78	13,32	5,46
45,75	1,92	3,67	0,08	0,01	1,65	30,83	15,54	5,46
63,25	0,25	4,54	0,04	0,01	2,36	26,67	24,42	6,61
71,75	0,00	4,49	0,02	0,01	2,30	24,44	27,20	7,20
87,00	0,00	4,98	0,02	0,01	2,38	23,89	27,20	6,91
94,00	0,00	4,99	0,02	0,01	2,42	22,50	25,53	5,97
112,50	0,00	5,18	0,02	0,01	2,52	24,17	27,75	7,17

Tabelas A.5 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, IgG, carboidratos e aminoácidos do experimento ES5 produzido com a linhagem ED9 355 A18 em frasco spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL à temperatura de 37°C, agitação de 75 rpm, meio de cultura RPMIS.

A – Crescimento celular e produção de AM anti-AB

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	pH
0	1,96E+05	99,36	7,53
8,50	2,56E+05	97,89	7,38
17,50	2,87E+05	97,70	7,43
23,50	2,78E+05	97,41	7,45
33,50	3,56E+05	99,04	7,43
46,75	4,70E+05	98,39	7,42
56,75	7,53E+05	96,97	7,35
63,50	8,24E+05	97,42	7,43
71,75	9,08E+05	95,13	7,31
80,50	9,54E+05	88,03	7,16
105,25	1,14E+06	74,31	6,95
113,50	1,13E+06	56,00	6,97
128,75	1,06E+06	29,04	6,90

B – Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (horas)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Pro (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônio (mM)
0	1,31	0,29	0,09	0,03	2,57	35,69	1,38	4,65
17,50	2,05	1,69	0,09	0,03	1,93	37,64	2,75	4,23
23,50	2,15	2,17	0,10	0,02	1,71	35,42	3,30	3,69
33,50	2,94	3,20	0,10	0,03	1,45	36,53	4,41	3,98
46,75	3,04	4,01	0,08	0,01	0,85	35,56	6,33	4,30
56,75	3,50	5,32	0,09	0,01	0,55	34,17	9,09	4,98
63,50	2,83	5,28	0,07	0,02	0,37	31,25	10,46	3,97
71,75	3,09	5,96	0,07	0,02	0,37	30,83	13,49	5,31
80,50	2,76	6,24	0,06	0,02	0,38	29,72	15,97	5,78
95,00	2,30	6,50	0,06	0,02	0,41	30,42	21,20	6,10
105,25	1,58	5,88	0,04	0,01	0,38	27,50	21,75	6,45
113,50	1,75	7,39	0,05	0,02	0,50	24,44	20,37	6,83
128,75	1,40	7,36	0,04	0,01	0,53	22,92	16,80	6,88

Tabelas A.6 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, IgG, carboidratos e aminoácidos do experimento ES6 produzido com a linhagem ED9 355 A18 em frasco spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL à temperatura de 37°C, agitação de 75 rpm, meio de cultura RPMIS suplementado com 2,575 mg/L Pro, 7,7 mg/L de Cys, 15 mg/L de Gln.

A – Crescimento celular e produção de AM anti-AB

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	pH	AM (mg/L)
0	2,06E+05	98,18	7,52	0,52
6,50	2,55E+05	97,95	7,30	--
19,50	2,75E+05	98,18	7,29	0,30
26,25	3,48E+05	98,73	7,33	--
33,50	4,37E+05	99,22	7,38	0,33
43,00	5,26E+05	98,29	7,27	--
53,50	7,15E+05	97,90	7,30	0,48
67,50	8,36E+05	95,80	7,24	0,49
74,50	9,59E+05	94,16	7,24	0,52
91,50	1,08E+06	90,70	7,10	0,61
102,50	1,16E+06	84,11	7,28	0,69
117,50	1,26E+06	73,83	6,90	--
125,00	1,26E+06	64,95	6,95	0,56
142,50	1,23E+06	25,05	6,85	0,60

B – Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (horas)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Pro (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônio (mM)
0	2,09	0,27	0,11	0,05	2,37	27,22	0,58	2,71
19,50	3,15	1,83	0,13	0,04	1,75	30,42	3,11	4,23
33,50	3,28	2,56	0,09	0,01	1,06	33,00	7,43	--
53,50	4,22	4,54	0,10	0,00	0,36	35,42	10,19	4,30
74,50	3,05	5,27	0,06	0,00	0,37	32,22	15,22	4,92
91,50	2,12	6,16	0,05	0,00	0,44	33,33	22,59	5,85
102,50	1,36	6,20	0,03	0,00	0,51	26,33	22,51	6,27
125,00	0,29	6,87	0,02	0,00	0,57	29,58	34,69	7,29
142,50	0,00	7,63	0,02	0,00	0,80	21,11	28,14	6,25

Tabelas A.7 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, IgG, carboidratos e aminoácidos do experimento ES7 produzido com a linhagem ED9 355 A18 em frasco spinner de 500mL com volume de trabalho de 200mL à temperatura de 37°C, agitação de 75 rpm, meio de cultura MQYS.

A – Crescimento celular e produção de AM anti-AB

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	pH	AM (mg/L)
0	2,12E+05	99,34	7,42	0,051
11,50	4,09E+05	98,69	7,21	--
21,50	6,14E+05	99,84	7,17	0,33
30,00	8,25E+05	99,54	7,12	0,67
37,00	1,12E+06	99,62	7,10	0,76
45,50	1,40E+06	97,06	7,12	1,37
54,50	1,57E+06	95,67	7,12	1,37
60,00	1,42E+06	86,97	7,05	1,50
79,00	1,42E+06	32,04	6,89	--
96,00	1,40E+06	17,43	6,87	0,91

B – Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (horas)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Pro (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônio (mM)
0	4,14	0,29	0,50	0,30	0,82	31,39	2,75	5,27
11,50	4,72	0,72	0,53	0,33	0,87	31,94	4,96	5,05
21,50	--	0,65	--	--	--	29,44	7,71	5,01
30,00	2,98	1,78	0,54	0,36	0,89	29,72	11,01	5,15
37,00	2,64	2,12	0,48	0,35	0,80	28,06	14,87	5,39
45,50	1,52	2,88	0,49	0,36	0,83	26,11	19,27	6,28
54,50	0,66	3,54	0,46	0,37	0,86	26,67	21,48	5,88
60,00	0,81	3,21	0,44	0,33	0,78	25,00	20,37	--
68,00	0,47	3,63	0,45	0,34	0,82	21,67	16,52	5,91
96,00	0,30	3,89	0,44	0,33	0,84	24,17	22,03	5,67

Tabelas A8 A e B: Valores experimentais de concentração celular, viabilidade, IgG, carboidratos e aminoácidos do experimento EB8 produzido com a linhagem ED9 355 A18 em biorreator de 2L com volume de trabalho de 650 mL à 37°C, agitação de 80 rpm, meio de cultura MQYS, oxigênio dissolvido em 40% da saturação com ar.

A – Crescimento celular e produção de AM

Tempo (horas)	Células Totais (Cel/mL)	Viabilidade (%)	pH	AM (mg/L)
0	2,30E+05	98,17	7,31	0,033
8,00	3,97E+05	99,04	7,45	--
16,00	5,47E+05	99,05	7,07	0,38
23,00	6,88E+05	99,70	7,29	0,68
32,00	9,48E+05	98,69	7,23	1,28
39,50	1,25E+06	97,80	7,15	1,42
48,00	1,60E+06	97,66	6,95	1,64
56,50	2,09E+06	95,46	7,10	2,09
63,00	2,05E+06	85,43	7,07	2,36
70,50	2,18E+06	75,24	7,00	2,05
81,50	2,28E+06	57,77	7,00	2,26
87,50	2,16E+06	44,27	7,00	--
105,00	2,00E+06	16,04	7,00	1,16

B – Consumo/Produção de aminoácidos e carboidratos

Tempo (horas)	Gln (mM)	Ala (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Pro (mM)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônio (mM)
0	12,06	0,92	1,28	0,56	2,44	24,17	2,53	4,00
8,00	9,79	1,36	1,02	0,49	1,98	24,33	3,74	4,50
16,00	12,27	2,59	1,42	0,70	2,65	24,22	5,07	5,07
23,00	9,51	3,26	1,22	0,53	2,53	25,67	7,27	5,64
32,00	8,19	5,15	1,15	0,52	2,33	22,00	10,13	6,78
39,50	5,63	6,59	1,09	0,54	2,41	19,67	13,88	7,85
48,00	3,61	8,64	0,97	0,55	2,25	18,11	16,41	8,57
56,50	1,62	12,46	1,07	0,63	2,85	17,33	18,17	9,99
63,00	0,52	11,07	0,91	0,54	2,65	16,28	19,05	9,99
70,50	0,00	11,37	0,79	0,45	2,47	16,22	20,70	9,99
81,50	0,00	13,11	0,86	0,48	2,77	15,72	21,37	10,71
105,00	0,00	14,46	0,92	0,51	2,99	15,56	21,81	10,71