

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

**Avaliação Diferencial de Fatores Fisiológicos e Cinéticos
em Cultivos de Linhagens de Células Selvagem e Recombinante
de *Drosophila melanogaster* S2**

Clóvis Sacardo da Silva

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo

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

SÃO CARLOS –SP

2006

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

S586ad

Silva, Clóvis Sacardo da.

Avaliação diferencial de fatores fisiológicos e cinéticos em cultivos de linhagens de células selvagem e recombinante de *Drosophila melanogaster* S2 / Clóvis Sacardo da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
109 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Engenharia bioquímica. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Aminoácidos. 4. Apoptose. 5. Velocidade específica de respiração. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo pela orientação, durante esses dois anos de trabalho.

À doutoranda Kamilla Swiech pela valorosa colaboração e apoio durante a realização desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan (SP) por possibilitar o desenvolvimento do trabalho com infraestrutura e fornecimento de material para pesquisa.

Ao Amadeus pela importante ajuda prestada, atenção e paciência, à Sheila, Rodrigo Bettega e Álvaro, pelo companheirismo e amizade, e a todos os demais amigos do laboratório Latecc, Patrícia, Marina, Marcelo, Mabel, Douglas, Luiz Cláudio.

Agradeço por tudo e a todos que me ajudaram de alguma forma neste trabalho.

À CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	vi
NOMENCLATURA	viii
LISTA DE SÍMBOLO	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Desenvolvimento da vacina anti-rábica	3
2.2. Sistemas de expressão de proteínas recombinantes	4
2.3. Características da célula de inseto <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider S2	6
2.4. Meio de cultivo para células de inseto	8
2.5. Cultivo celular	12
2.6. O estado fisiológico da célula	15
2.5.1. Morte celular	16
2.5.2. Necrose e apoptose	16
2.7. Consumo de nutrientes das células de insetos	19

2.8. Acúmulo de subprodutos no cultivo de células de inseto	20
2.9. Oxigênio no cultivo	21
2.4. Comentários gerais	24
3. MATERIAIS E METODOS	26
3.1. Materiais	26
3.1.1. Células utilizadas	25
3.1.2. Meio de cultura	26
3.1.3. Corantes para determinar viabilidade celular	26
3.1.4. Solução tampão salina	27
3.1.5. Equipamentos	28
3.1.5.1. Câmara asséptica	28
3.1.5.2. Microscópio	28
3.1.5.3. Autoclave	28
3.1.5.4. Frasco Schott modificado	28
3.1.5.5. Câmara de incubação rotatória	29
3.2. Procedimento experimental para o cultivo de células	29
3.3. Avaliação de métodos para análise de viabilidade	31
3.3.1. Determinação da concentração e viabilidade celular	31
3.3.2. Quantificação de apoptose e viabilidade celular usando corantes fluorescentes	32
3.4. Avaliação da influencia do inóculo no crescimento das células S2	32
3.5. Métodos analíticos	35
3.5.1. Concentração de glicose e aminoácidos	35

3.5.2. Medida da transferência de oxigênio	36
3.5.3. Método para determinação Q_{O_2}	37
3.5.4. Variação do oxigênio durante o cultivo das células S2 em frasco Schott	38
3.6. Programação e estratégia experimental seguida nesta pesquisa	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Definição de uma metodologia para quantificação viabilidade das células S2	41
4.2. Consumo de nutrientes e viabilidade celular	45
4.3. Análise da influência do inóculo no crescimento das células S2 e rS2	54
4.4. Análise do planejamento fatorial	57
4.5. Análise da oxigenação do meio no crescimento celular	59
4.5.1. Transferência de oxigênio no frasco Schott	59
4.5.2. Características de respiração das células S2 e rS2	61
4.5.3. Estudo da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) das células rS2 em Schott de 100 mL	71
5. CONCLUSÕES	80
6. SUGESTÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICE	96

Lista de Figuras

- Figura 2.1. O crescimento da célula de inseto Sf-9 em vários meios livres de soro (SFM) e meio suplementado com soro fetal bovino (FBS). Figura adaptada da INVITROGEN (2003). 10
- Figura 2.2. Esquema do frasco spinner para cultivo de células de inseto. 13
- Figura 2.3. Esquema geral da diferença entre apoptose e necrose em células animais (BioAgency, 2004). 19
- Figura 3.1. Representação esquemática do frasco Schott modificado para realização de cultivo envolvendo células de inseto S2. 29
- Figura 3.2. Representação esquemática do procedimento seguido nos experimentos de cultivos das células inseto. 30
- Figura 3.3. Exemplo de gráfico para determinação da produtividade máxima de células. 35
- Figura 3.4. Variação da concentração de O_2 dissolvido com tempo durante a utilização do método dinâmico para determinar Q_{O_2} . 37
- Figura 3.5. Esquema do sistema experimental utilizado para a determinação da queda do oxigênio no frasco Schott. (1) Entrada de ar; (2) Saída de gás; (3) Frasco Schott modificado. 39
- Figura 4.1. Resultados dos experimentos E1-S2 e E2-rS2 utilizando as células S2 e rS2, respectivamente, para comparação de porcentagem das células viáveis totais entre o método de exclusão corante azul de Trypan e método de fluorescência. 42

Figura 4.2. Evolução da viabilidade celular no experimento E1-S2.	43
Figura 4.3. Evolução da viabilidade celular no experimento E2-rS2.	44
Figura 4.4. Identificação de várias populações de células em microscópio de fluorescência durante o cultivo de células S2 e rS2. a) Células viáveis não apoptóticas (VNA). b) Células necróticas (Nec). c) Células livres de cromatina (CF). d) Células viáveis apoptóticas (VA). e) Células não viáveis apoptóticas (NVA).	45
Figura 4.5. Resultados de crescimento celular no cultivo das células S2 e rS2 nos experimentos E3-S2 e E4-rS2.	46
Figura 4.6. Evolução da viabilidade celular no experimento E3-S2 monitorada com o método da fluorescência.	47
Figura 4.7. Evolução da viabilidade celular no experimento E4 -rS2 monitorada com o método da fluorescência.	47
Figura 4.8. Consumo de aminoácidos no cultivo das células S2 no experimento E3-S2 em frasco Schott de 100 mL a 28°C e 100 rpm.	48
Figura 4.9. Consumo de aminoácidos no cultivo das células rS2 no experimento E4-rS2 em frasco Schott de 100 mL a 28°C e 100 rpm.	49
Figura 4.10. Porcentagem do consumo de aminoácido das células de inseto S2 e rS2 após 216 h de cultivo nos experimentos E3-S2 e E4-rS2.	50
Figura 4.11. Consumo de aminoácidos correlacionado com a porcentagem de células S2 apoptóticas no experimento E3-S2.	51
Figura 4.12. Consumo de aminoácidos correlacionado com a porcentagem de células rS2 apoptóticas no experimento E4-rS2.	51

- Figura 4.13. Consumo de glicose durante os experimentos E5-rS2 e E6-S2 com as células rS2 e S2, respectivamente, cultivadas em frasco Schott de 100 mL, com meio Sf-900 II em correlação com a viabilidade e a concentração celular. 52
- Figura 4.14. Consumo de glicose e glutamina durante os experimentos E5-rS2 e E6-S2 das células rS2 e S2, respectivamente, cultivadas em frasco Schott de 100 mL com meio Sf-900 II correlacionado com a porcentagem de células apoptóticas no cultivo das células rS2 e S2. 53
- Figura 4.15. Resultados do crescimento das células rS2 em experimentos realizados com diferentes concentrações de inóculo (C_{ino}) e idades inóculo (I_{ino}) em frasco Schott de 100 mL, agitação 100 rpm e meio Sf-900 II. 56
- Figura 4.16. Efeitos padronizados dos experimentos do planejamento fatorial de 2^2 considerando a resposta das variáveis: (A) Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}); B) Concentração máxima de células (C_{max}) e C) Produtividade de célula (P_{max}). 58
- Figura 4.17. Variação da concentração do oxigênio dissolvido no frasco Schott de 250ml com volume de trabalho de 50 mL, durante a utilização do método dinâmico oxigenando água a: a) 1 vvm, b) 2 vvm, c) 3 vvm e o meio Sf-900 II a: 1 vvm. 60
- Figura 4.18. Resultados do crescimento e viabilidade celular das células S2 e rS2 nos experimentos realizados com diferentes vazões de ar com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C. 62
- Figura 4.19. Consumo de glicose nos cultivos das células S2 e rS2 com diferentes vazões de ar com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C. 63

- Figura 4.20. Consumo de glutamina nos cultivos das células S2 e rS2 com diferentes vazões de ar com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C. 63
- Figura 4.21. Curvas de crescimento celular e variação de oxigênio dissolvido nos experimentos E7-rS2 e E8-S2 com as células rS2 e S2, com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C. 65
- Figura 4.22. Curva de crescimento celular e variação de oxigênio dissolvido no experimento E9-S2 com as células S2 no frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C. 66
- Figura 4.23. Estado morfológico das células S2 no E9-S2 em sistema com excesso de oxigênio (120%) inicial: A) 48 h e C) 118 h. E sistema sem oxigenação no E4-rS2: B) 48 h e D) 118 h de cultivo. 67
- Figura 4.24. Curvas de Q_{O_2} em função do tempo dos experimentos E7-rS2, E8-S2 e E9-S2 com as células S2 e rS2 utilizando vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial no frasco Schott de 250 mL, agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C. 68
- Figura 4.25. Curvas de Q_{O_2} e crescimento celular das células High FiveTM (Tn-5) e Sf-9, ambas as células cultivadas em meio Sf-900 II, biorreator Applikon, com volume de trabalho de 1,4 L em função do tempo de cultivo celular. Gráfico adaptado dos estudos realizados por RHIEL *et al.* (1997). 69
- Figura 4.26. Variação Q_{O_2} com a concentração de oxigênio dissolvido (C_{O_2}) das células S2 e rS2 em experimentos com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial em frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100rpm e temperatura de 28°C. 70

- Figura 4.27. Resultados do experimento E11-rS2, com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 100 mL, com volume de trabalho de 20 mL, meio Sf-900 II, temperatura de 28°C e agitação orbital de 100 rpm. 73
- Figura 4.28. Variação Q_{O_2} com a concentração de oxigênio dissolvido (C_{O_2}) das células rS2 no experimento E11-rS2, com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 100 mL, com volume de trabalho de 20 mL, meio Sf-900 II, temperatura de 28°C e agitação orbital de 100 rpm. 74
- Figura 4.29. Variação de pH, agitação, viabilidade e crescimento celular das células rS2 cultivadas em meio Sf-900 II no biorreator Applikon, com volume de trabalho de 0,75 L em função do tempo de cultivo celular. Gráfico adaptado dos estudos realizados por SWIECH (2005). 75
- Figura 4.30. Variação de Q_{O_2} das células rS2 e oxigênio dissolvido em função do tempo de cultivo celular do experimento realizado por SWIECH (2005) e o experimento E11-rS2 e E7-rS2. 76
- Figura 4.31. Resultados do crescimento e viabilidade celular das células rS2 nos experimentos realizados com diferentes agitações (90, 100 e 120 rpm) utilizando o frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL. 78

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Lista das nove linhagens de células de inseto investigado com potencial para sistema de expressão de proteínas recombinante.	6
Tabela 2.2. Proteína recombinantes expressa por células de <i>Drosophila melanogaster</i> .	7
Tabela 2.3. Meios suplementados com soro fetal bovino (FBS) para cultura de inseto.	9
Tabela 2.4. Meios livres de soro (SFM) comercialmente disponíveis para cultura de células de inseto.	10
Tabela 2.5. As vantagens e desvantagens do uso de SFM (CARTWRIGHT, 1994).	11
Tabela 2.6. Vantagens e desvantagens para os métodos de cultura em monocamada e suspensão.	14
Tabela 2.7. Indução de apoptose em condições de cultura de células animais.	17
Tabela 2.8. Características dos experimentos no biorreator para investigar o efeito da oscilação da concentração do oxigênio dissolvido (RHEIL & MURHAMMER, 1995).	23
Tabela 3.1 Concentração de componentes identificados em trabalhos que utilizaram o meio Sf-900 II.	27
Tabela 3.2. Composição da solução tampão salina.	27
Tabela 3.3. Ensaio realizados e suas principais características.	40
Tabela 4.1. Resultados dos experimentos de cultivo com células rS2 em meio Sf-900 II variando a concentração e idade do inóculo.	56
Tabela 4.2. Valores de $k_L a$, para diversas vazões de ar no espaço gasoso de um frasco Schott de 250 mL.	60

Tabela 4.3. Característica dos experimentos realizados para monitoramento do oxigênio dissolvido no caldo de cultivo no frasco Schott de 250 mL.	61
Tabela 4.4. Resultados obtidos nos experimentos utilizando as células S2 e rS2 realizados com vazão de ar de 1vvm no espaço gasoso do frasco Schott de 250 mL, em relação μ_{\max} e concentração máxima de células.	67
Tabela 4.5. Características dos experimentos utilizando frasco Schott de 100 mL, para monitoramento do oxigênio dissolvido e influência da rotação.	71
Tabela 4.6. Valores de Q_{O_2} no início e final da fase de crescimento exponencial das células rS2 na presença do eletrodo de oxigênio dissolvido para diferentes volumes de trabalho.	75
Tabela 4.7. Resultados obtidos nos experimentos utilizando as células rS2 utilizando frasco Schott de 100 mL e diferentes condições de agitação, em relação μ_{\max} e concentração máxima de células.	79

NOMENCLATURA

Ala	Alanina
Asp	Aspartato
Arg	Arginina
Bm-5	Célula <i>Bombxy mory</i> linhagem 5
BVDV	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> (Vírus da Diarréia Viral Bovina)
Cys	Cisteína
EMEA	Agência europeia para o desenvolvimento de produtos medicinal
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Agência americana de gerenciamento de alimentos e medicamentos
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
His	Histidina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Ile	Isoleucina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
rADN	ADN (ácido desoxirribonucléico) recombinante
rS2	Células recombinante Schneider linhagem 2
Ser	Serina
SVEB	Sistema vetor de expressão baculovirus
S2	Células <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider linhagem 2
SFM	Meio livre de soro
Sf-9	Célula <i>Spodoptera frugiperda</i> linhagem 9
Tn	Célula <i>Trichoplusia ni</i>
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Val	Valina

LISTA DE SÍMBOLO

abrev.	nome	unidade
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica de crescimento celular máxima	h^{-1}
$P_{m\acute{a}x}$	Produtividade máxima	células/mL.h
C_s	Concentração de saturação de oxigênio	mmol/mL
Q_{O_2}	Velocidade específica de respiração	mmol/célula.h
μ	Velocidade específica de crescimento	h^{-1}
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de O_2	s^{-1}
OD	Oxigênio dissolvido	mmol/L
C_{O_2}	Concentração de oxigênio dissolvido	mmol/L
I_{ino}	Idade do inóculo	h
C_{ino}	Concentração de célula do inóculo	células/mL
C_{max}	Concentração máxima de célula	células/mL
Viab.	Viabilidade celular	%
t	Tempo de cultivo	h

Resumo

Nos últimos 10 anos a célula de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider S2 tem se destacado nos estudos de proteínas recombinantes. Entretanto, encontra-se na literatura pouco estudo dos parâmetros relacionado ao uso da célula de inseto *Drosophila melanogaster* em bioprocessos. O presente trabalho foram avaliados fatores fisiológicos importantes no do cultivo das células de inseto *Drosophila melanogaster* S2 (S2) e recombinante S2 (rS2) através de cultivos em frasco Schott e meio livre de soro a 28°C. Realizaram-se experimentos nos quais foi acompanhada a viabilidade celular das células de insetos pelos métodos de exclusão de corante azul de Tripán e de corantes fluorescentes. Ambos os métodos utilizados nos experimentos para acompanhar a viabilidade do cultivo das células S2 e rS2 se mostraram confiáveis para identificação da porcentagem de células viáveis. Os estudos demonstraram que o crescimento das células S2 e rS2 não foram limitados pelo consumo total de aminoácidos e glicose.

Nos experimentos utilizando as células rS2 para verificar a influência da idade e concentração do inóculo, verificou-se que ambos os parâmetros não tem influência na velocidade específica de crescimento máxima.

Foram realizados experimentos em frasco Schott de 250 mL com volume de trabalho de 50 mL, nos quais foram monitoradas as concentrações de oxigênio dissolvido (OD) nos caldos de cultivo das células S2 e rS2. Os resultados demonstraram que o cultivo atingiu a fase estacionária com nível muito baixo de oxigênio dissolvido. Sendo este um fator limitante do crescimento das células. A velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) demonstrou um decréscimo acentuado na fase exponencial de crescimento exceto para fase estacionária. O excesso de oxigênio na fase inicial do cultivo foi prejudicial para o crescimento das células. Entretanto, nos experimentos realizados em frasco Schott de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL, Q_{O_2} das células rS2 apresentou-se 10 a 15 vezes menor que realizados no frasco Schott de 250 mL.

Os experimentos realizados em frasco Schott de 100mL com diferentes agitações demonstraram que para baixa agitação, a transferência de oxigênio deve ser um fator limitante no crescimento celular. A viabilidade celular para todos os experimentos realizados em diferentes agitações se manteve entre 95 e 99% de células viáveis, indicando que as células estavam em bom estado fisiológico.

ABSTRACT

In the last 10 years the insect cell *Drosophila melanogaster* Schneider S2 has been increasingly used for studies of proteins recombinants. However, there is a lack of studies that involved parameters related to the use of the insect cell *Drosophila melanogaster* in bioprocess. The aim of this work was to study the factors physiologies important in the cultures of the insect cells *Drosophila melanogaster* S2 (S2) and recombinant S2 (rS2), through cultures in Schott flask, serum free medium at 28°C. There were performed experiments with the purpose of monitoring the viability cellular of insect cells by the methods of exclusion of Trypan blue and of fluorescent dyes. Both methods used in the experiments to monitor the viability of the cultures of the cells S2 and rS2 were shown reliable for the identification of the percentage of viable cells. The studies revealed that growth of S2 and rS2 cells was not limited by the total consumption of amino acids and glucose.

In the experiments utilizing the rS2 cells to verify the influence of the age of the inoculum and concentration of the inoculum, it was verified that both parameters did not have influence in the growth specific rate.

Experiments done in Schott flask of 250 mL with a working of 50 mL, in which were monitored the concentration of dissolved oxygen (DO) in the broths of cultivation of the cells S2 and rS2. The results demonstrated that the cultivation reaches the stationary phase with very low level of dissolved oxygen, whit DO being a limiting factor of the growth of the cells. The specific oxygen consumption rate (Q_{O_2}) demonstrates an accentuated decrease in the exponential phase of growth, except for stationary phase. The excess of oxygen in the initial phase of the cultivation was harmful to the growth of the cells. However, in the experiments done in Schott flask 100 mL with a working volume of 20 mL, Q_{O_2} of the cells rS2, revealed 10 to 15 times smaller than these performed in the Schott flask of 250 mL.

The experiments done in Schott flask of 100 mL with different agitations demonstrated that for low agitation the transfer of oxygen should be a limiting factor in the cellular growth. The cellular viability for all of the experiments performed in different agitations stayed between 95 and 99% of viable cells indicating that the cells were in good physiologic state.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento rápido da biotecnologia durante os últimos 20 anos se deve principalmente aos avanços conseguidos em engenharia genética. Vários sistemas de expressão têm sido desenvolvidos em bactérias, leveduras, células de plantas e células animais para uso na produção de proteínas de grande interesse para a humanidade. A seleção de um sistema ótimo de expressão é muito importante para obter alto rendimento na produção da proteína com alto grau de pureza e baixo custo de produção. Porém, a escolha do sistema de expressão está baseada na funcionalidade da proteína expressa, pois muitas proteínas requerem modificações pós-traducionais como a glicosilação, por exemplo, fundamentais para a correta atividade biológica.

A utilização de células animais para expressão de biomoléculas vem sendo cada vez mais escolhida pelas indústrias farmacêuticas, devido à qualidade das proteínas obtidas com esse tipo de células. Comercialmente, as proteínas provenientes de células recombinantes animais devem ocupar 10% do mercado mundial de produtos farmacêuticos, tornando-se um setor de multi-bilhão de dólares na biotecnologia (AL-RUBEAI, 2004).

Nos últimos 10 anos a célula de inseto de *Drosophila melanogaster* tem sido destaque na expressão e estudos de proteínas recombinantes, incluindo moléculas de adesão de células (BELLOSTA *et al.*, 1994), antígenos virais (BRIGHTY *et al.*, 1991; BRIGHTY & ROSENBERG, 1994; DEML *et al.*, 1999), oncogenes (GETLER *et al.*, 1995), anticorpos (KIRKPATRICK *et al.*, 1995), receptores (JOHANSON *et al.*, 1995; TOTA *et al.*, 1995) e fatores de transcrição (COUREY & TJIAN, 1998). Na maioria dos casos, as proteínas testadas foram processadas confiadamente e biologicamente ativas. Entretanto, há pouca informação disponível sobre parâmetros cinéticos relacionados ao uso da célula de inseto *Drosophila melanogaster* em bioprocessos, gerando a necessidade de uma adaptação e aperfeiçoamento de

conhecimentos concernentes à engenharia de bioprocessos para satisfazer esta nova demanda tecnológica.

Porém, é importante levar em consideração que qualquer estratégia de investigação ou de desenvolvimento de bioprocessos envolve formulação de meio de cultura, otimização das condições operacionais e estudos de aumento de escala, exigindo o conhecimento de alguns parâmetros como a velocidade específica de crescimento celular, de respiração, de consumo ou produção de metabólitos chaves, que permitem comparar entre si diferentes bioprocessos, mesmo que conduzidos de formas diferentes (NEVES *et al.*, 2001).

Neste contexto, uma interação entre o Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular (LATECC) do Departamento de Engenharia Química da UFSCar e o Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan vem sendo realizada com o objetivo de desenvolver o bioprocessos do cultivo de células de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider S2 para produção de vacina anti-rábica em larga escala. O trabalho consiste na modificação genética e seleção das células de inseto recombinante S2 (rS2) pelo Instituto Butantan e comparação fisiológica de ambas células de inseto S2 e rS2 pelo LATECC, pois as células não recombinantes normalmente apresentam características de crescimento celular diferentes em relação às células recombinantes, devido à modificação genética (KEITH *et al.*, 1999).

1.1. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo estudar parâmetros fisiológicos do cultivo das células de inseto *Drosophila melanogaster* S2 e rS2 como velocidade específica de crescimento celular, consumo de nutrientes (glicose e aminoácidos), velocidade específica de respiração e viabilidade celular, através de cultivos em frasco Schott e meio livre de soro, visando à obtenção de dados importantes para o desenvolvimento do bioprocessos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desenvolvimento da vacina anti-rábica

O vírus da raiva causa uma forma fatal de encefalomielite, que constantemente produz vítimas tanto em seres humanos como em animais domésticos e selvagens. A maioria das vacinas de raiva humana é produzida de cultivo de tecido infectado. Podemos destacar cultivos em células diplóides humanas (CDH) e células VERO, cujas vacinas podem ser admitidas para uso profilático sem preocupações de efeitos colaterais com os que tinham sido associados o vacinas de produzida em cérebro de camundongo. As vacinas da raiva humana são usadas normalmente como um agente terapêutico pós-exposição das pessoas mordida por animal raivoso, mas países em desenvolvimento não são auto-suficientes na produção de vacinas da raiva para uso humano. Além disso, o processo da produção da vacina da raiva inclui passos perigosos em controlar quantias grandes de materiais infecciosos (COSTA *et al.* 2000).

No entanto, com desenvolvimento da engenharia genética está sendo possível o desenvolvimento de vacinas recombinante preparadas a partir da glicoproteína do vírus da raiva. A glicoproteína do vírus da raiva é antígeno de superfície, responsável pela formação de anticorpos neutralizantes (COLL, 1995).

Vários sistemas têm sido estudados para expressão da glicoproteína do vírus da raiva tais como bactérias, leveduras e células eucariontes. A proteína expressa pelo sistema de bactéria (*Escherichia coli*) não protegeram os ratos nos teste realizados em laboratório, devido a falta da glicosilação não realizado pelas as bactérias (YELVERTON *et al.*, 1983).

O sistema com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) nem toda forma de glicoproteína do vírus da raiva pode ser produzida. SAKAMOTO *et al.* (1998) investigaram duas formas de glicoproteína do vírus raiva (designadas como yGI e yGII, peso molecular 66 e 56 kDa).

Ambas formas yGI e yGII foram produzidas, mas somente yGII induziu imunidade protetora em porcos da guiné. Além disso, a forma yGII foi produzida em baixa quantidade 30-40 ng/mL.

A produção da glicoproteína do vírus da raiva em células eucariontes tem se demonstrado eficiente imunogenicamente e antigenicamente. GUPTA *et al.* (2005) utilizando células de mamífero MDBK (*Madin Darby bovine kidney*), demonstraram que as células expressam a forma solúvel da glicoproteína do vírus da raiva.

O estudo em células eucariontes tem a vantagem de que não há nenhuma manipulação vírus vivo, assim o antígeno da glicoproteína do vírus da raiva pode ser produzido sem risco de infecção para humano ou animais. Além disso, a proteína da recombinante é expressa continuamente no sobrenadante da cultura de células que pode ser purificado usando cromatografia de afinidade sem contaminantes celulares.

2.2. Sistemas de expressão de proteínas recombinantes

Nas últimas duas décadas inúmeros sistemas de expressão de proteínas recombinantes altamente eficiente têm sido desenvolvidos com base na utilização de bactérias, leveduras, células de mamíferos e insetos.

O sistema de expressão de proteínas recombinantes com bactéria mais comum é *Escherichia coli*, devido a sua simplicidade para manipulação e custo do meio de cultivo mais barato. Entretanto, *Escherichia coli* não tem sido satisfatoriamente aprovado para a produção de proteínas grandes e complexas, como enzimas, antígenos virais e anticorpos monoclonais. Isto é porque, muitas proteínas produzidas em células passam por umas inúmeras modificações químicas pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, carboxilação, amidação, acetilação e formação de ligações de enxofre (BANEYX, 1999; CARTWRIGHT,

1994). Leveduras como *Pichia pastoris* e *Sacharomyses cerevisiae* são organismos mais complexos que a *Escherichia coli* e executam algumas modificações pós-traducionais tal como glicosilação, mas os processos com levedura costumam ser mais complexos que os microbianos (CEREGHINO & CREGG, 1999). No entanto, as células de mamíferos tais como CHO e BHK efetuam modificações pós-traducionais semelhantes às das células humanas, mas a manutenção dessas células em cultura tem custo mais elevado, exigindo cuidados rigorosos em relação à contaminação (GOOSEN, 1993).

Por outro lado, as células de inseto são capazes de promover os vários tipos de modificações pós-traducionais já mencionados. A glicosilação (adição de açúcares a cadeia protéica) uma das mais importantes é basicamente similar à realizada por células de mamíferos, pois esta modificação permite a correta atividade da proteína.

A célula de inseto em conjunto com o sistema vetor de expressão baculovirus (SVEB) tem sido alvo de inúmeros estudos tanto na produção de bioinseticidas quanto na produção de proteínas recombinantes de interesse industrial. No entanto, SANDERSON *et al.* (1999) lista algumas dificuldades com o SVEB como a produção de proteases, não secreção de produto, lise da célula e incompleta glicosilação.

KEITH *et al.* (1999) destacam em seu trabalho nove linhagens (Tabela 2.1) de células de inseto com potencial para o sistema de produção de proteína recombinante que podem ser obtidas comercialmente. Eles detiveram seus estudos em apenas cinco linhagens (Bm-5, High-Five, IPLB-LdFB, IZD-MB-0503, Sf-21), com destaque para linhagem de célula High-Five cultivada em meio IPL-41 suplementado com 10% de soro fetal bovino que atingiu uma concentração final da proteína (GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) desejada de 22,8 mg/L em cultura em suspensão e 46 mg/L em cultura estática.

Tabela 2.1. Lista das nove linhagens de células de inseto investigadas com potencial para sistema de expressão de proteínas recombinantes.

Linhagem de células	Espécies
Bm-5	<i>Bombyx mori</i>
Bm-N4	<i>Bombyx mori</i>
Hihg-Five	<i>Trichoplusia ni</i>
IAL-PiE	<i>Plodia interpunctella</i>
IPLB-HvE6	<i>Heliothis virescens</i>
IPLB-LdFB	<i>Lymantria dispar</i>
IZD-MB-0503	<i>Mamestra Brassicae</i>
Schneider's line 2	<i>Drosophila melanogaster</i>
Sf-21	<i>Spodoptera frugiperda</i>

2.3. Características da célula de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider S2

As células de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider-2 (S2) são derivadas de uma cultura primária de estágio tardio (20-24 horas) de embriões de *Drosophila melanogaster* (SCHNEIDER, 1972 *apud* INVITROGEN, 2003), e têm sido usadas progressivamente para expressão de proteínas heterólogas.

Uma das características é a estabilidade da célula S2 transfectada, que pode ter também a estabilidade pela co-transfecção de expressão de dois plasmídeos. Um aspecto único das células de inseto S2 é a possibilidade de completar perto de 1000 cópias de células transfectadas em um evento de transfecção-seleção. Portanto, um longo período de amplificação plasmídica e seleção de células clones não são requeridos (DEML *et al.*, 1999). No referente à expressão de proteína as células de *Drosophila* apresentam uma clara vantagem sobre as células de mamíferos, já que estas requerem meses de seleção para conseguir um alto número de cópias de gene alvo e altos níveis de produção de proteína.

IVEY-HOYLE (1991) relata em seu trabalho a versatilidade e conveniência da flexibilidade das células de *Drosophila*, tendo como destaque o crescimento em suspensão para alta densidade celular ($1 \text{ a } 2 \times 10^7$ células/mL). A Tabela 2.2 mostra algumas proteínas que foram expressas de maneira satisfatória em células de *Drosophila melanogaster*.

Outra característica importante é que as células Schneider S2 podem tanto ser cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino (FBS – *fetal bovine serum*) como serem adaptadas para cultivo em meio livre de soro (SFM – *serum free medium*) (ARANTES, 2004).

Tabela 2.2. Proteínas recombinantes expressadas por células de *Drosophila melanogaster*.

Proteínas	Concentração (mg/L)	Referência
Glicoproteína envelope recombinante (gp 120)	1 – 35	IVEY-HOYLE (1991)
Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HbsAg)	1,8 – 4,75	DEML <i>et al.</i> (1999)
Proteína citosólica anexina XIIb (Anx XIIb)	1,6	BENTING <i>et al.</i> (2000)
Forma truncada da proteína VIP36	0,5	BENTING <i>et al.</i> (2000)
Proteína menin humana	1	VALLE <i>et al.</i> (2001)
Proteína verde fluorescente (GFP)	-	CHA <i>et al.</i> (2003)
Interleucina humana 2 (HIL-2)	2,3	CHA <i>et al.</i> (2003)

2.4. Meio de cultivo para células de inseto

Através da história da cultura de células de inseto, melhoramentos no projeto de meios de cultura têm levado ao aumento da produtividade das células na produção de vírus e proteínas recombinantes. Inicialmente, meios contendo FBS mostraram-se particularmente benéfico para a cultura de células de inseto. Contudo, devido às dificuldades apresentadas nas operações de purificação do produto e o conseqüente aumento no custo do processo, meios de cultivos não contendo soro foram desenvolvidos, os quais têm apresentado bom desempenho na produção de proteínas (CHAN *et al.*, 1998). Além da dificuldade que o soro apresenta no momento da purificação do produto (SILVA, 2004), HENSLER *et al.* (1994) e CRUZ *et al.* (1998) ressaltam a preocupação com possíveis agentes contaminantes no soro, por exemplo: a presença do Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV - *Bovine Viral Diarrhea Virus*) no FBS pode interferir na produção de vacina animal e processos de produção com uso de soro podem ter uma variabilidade na composição de lote para lote, uma vez que o soro representa uma mistura indefinida componente.

As necessidades nutricionais das células de inseto, como as de outras células animais, são extremamente complexas. Isto tem levado ao desenvolvimento de vários meios de cultura, desde o primeiro sucesso com o meio Grace's no cultivo de tecidos de célula de inseto. A composição do meio Grace foi baseada na hemolinfa de inseto a 5% (w/w). Contudo foi verificado que a hemolinfa de inseto poderia ser substituída por soro fetal bovino como fonte de vitaminas, fatores de crescimento e outros componentes não definidos.

Pelo fato de ser mais fácil de obter grandes quantidades de FBS sob condições controladas, este foi o suplemento escolhido. Meios de cultura para o cultivo de células de inseto passaram a ser suplementados com 4 a 20% de FBS (MARANGA *et al.*, 2002). Na Tabela 2.3 estão listados os principais meios desenvolvidos suplementados com FBS.

Tabela 2.3. Meios suplementados com FBS para cultura de células de inseto.

Meios	Formulação
<i>Grace's Insect Medium</i>	Mistura nutritiva de aminoácidos, vitaminas, carboidratos, suplementos orgânicos, inorgânicos e sais.
<i>Grace's Insect Medium – Vaughn's Modified</i>	Original <i>Grace's Insect Medium</i> com aumento na concentração de cloreto de potássio e um correspondente decréscimo na concentração de cloreto de cálcio.
<i>Hink's TNM-FH Insect Medium</i>	Original do meio <i>Grace's</i> suplementada com lactalbumina hidrolisada (LAH) e extrato de levedura (<i>yeastolate</i>)
<i>TC-100 Insect Medium</i>	Meio de cultivo de menor complexidade, não contém hemolinfa de inseto e albumina.
<i>Schneider's Drosophila</i>	Suplementado com L-Glutamina. Este meio é geralmente suplementado com soro (5-10% FBS).

Quando componentes de origem humana ou animal são adicionados ao meio de cultura, há um risco potencial de transferência de vírus como Encefalopatia Espongiforme Bovina precursor da doença da “Vaca Louca” (BSE - *Bovine Spongiform Encephalopathy*) que causa a degeneração cerebral. Recentemente agências reguladoras, como o FDA (*Food and Drug Administration*) ou EMEA (*Europe Agency for the Evaluation of Medicinal Products*), estão banindo o uso de soro, e assim, o SFM tem se tornado o padrão preferido na fase de desenvolvimento de processos (VAN DER POL & TRAMPER, 1998; MARANGA *et al.*, 2002).

No entanto, o desenvolvimento bem sucedido do meio livre de soro para cultivo de células de inseto como demonstra a Figura 2.1, tem resultado em várias formulações de meios comercialmente disponíveis não requerendo adição de soro para cultivo das células inseto Sf-9.

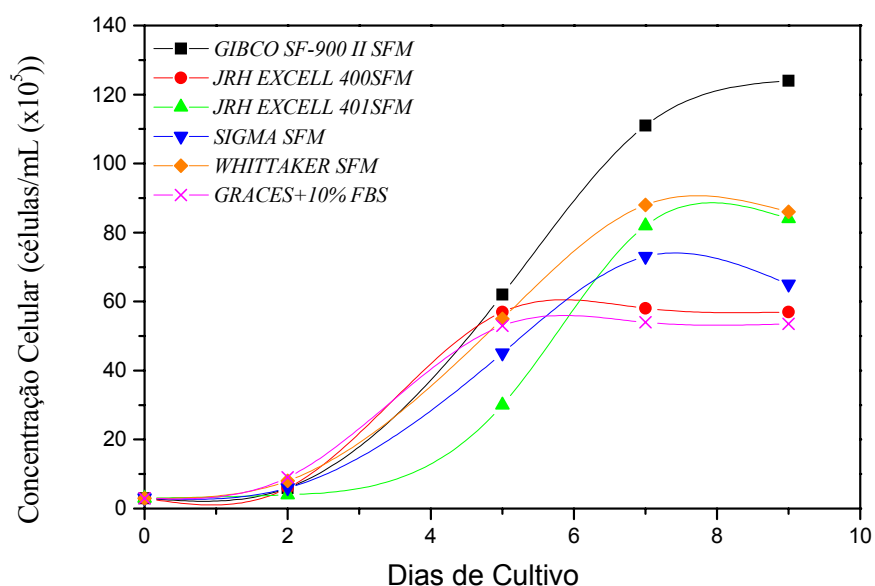


Figura 2.1. O crescimento da célula de inseto Sf-9 em vários meios livres de soro (SFM) e meio suplementado com soro fetal bovino (FBS). Figura adaptada da INVITROGEN (2003).

Na Tabela 2.4 estão listados alguns meios disponíveis comercialmente para cultura células de inseto e para tecnologia de rADN. Deve-se ressaltar que há inúmeros meios livres de soro (SFM) no mercado.

Tabela 2.4. Meios livres de soro (SFM) comercialmente disponíveis para cultura de células de inseto.

Meios	Composição	Aplicação	Célula de inseto
Sf-900 II	Livre de proteína e soro	Usado para sistema de vetor de expressão baculovirus (SVEB) para cultivo em monocamada ou suspensão.	Sf-9, Sf-21, Tn-368, adaptado para S2.
EX-CELL™ 420	L-Glutamina, Pluronic-F68 e glicose.	Sistema de suspensão ou monocamada.	Sf-9 e Sf-21 Schneider S2 (<i>Drosophila</i>)
<i>Drosophila</i> -SFM	Livre de proteína e soro	Sistema de suspensão ou monocamada.	<i>Drosophila</i> (D.Mel-2, Schneider S2)
Insectgro™	Livre de proteína e soro	Crescimento de <i>Drosophila</i> S2	Schneider S2 (<i>Drosophila</i>)

Os problemas com o uso do SFM surgem do não conhecimento total das necessidades nutricionais das células, sendo impossível preverem todos os componentes necessários em um meio quimicamente definido. Outros inconvenientes incluem a perda do efeito de proteção exercido pelo soro contra forças de cisalhamento e o longo tempo de adaptação para alguns tipos de célula. Além disso, as condições de crescimento da célula tornam-se mais críticas na ausência de soro (ex: menores variações no valor do pH do meio são toleradas pelas células) (CARTWRIGHT, 1994). A Tabela 2.5 resume as vantagens e desvantagens do uso de SFM no cultivo de células animais.

O esgotamento de nutrientes no meio de cultura tem sido apontado como a principal limitação em relação ao crescimento e à formação do produto em culturas de células de inseto (WU *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1998; DOVERSKOG *et al.*, 1997). Para atingir o objetivo de altas densidades de células e maiores produtividades na expressão de proteínas, várias estratégias têm sido utilizadas, entre elas, o melhoramento do meio de cultura, operação da cultura em batelada alimentada e cultura em perfusão (CARON *et al.*, 1994; BÉDARD *et al.*, 1997; ELIAS *et al.*, 2000).

Tabela 2.5. As vantagens e desvantagens do uso de SFM em cultivos de células animais (CARTWRIGHT, 1994).

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none">- Sem riscos de contaminação viral;- Composição do meio constante;- Garantia de suprimento de nutrientes;- Ambiente nutricional definido;- Maior facilidade de purificação de produto.	<ul style="list-style-type: none">- Cada tipo de célula pode requerer um meio diferente;- Pode ocorrer dificuldade em adaptação das células;- Perda dos efeitos positivos do soro.

Além das altas densidades de células, deve haver a preocupação com a produtividade do sistema. Uma importante característica do sistema célula de inseto é que a produtividade específica (isto é, produção por célula) diminui com o aumento da densidade celular. É o chamado “efeito da densidade celular”. Alguns autores sugerem como causas desse efeito à limitação de nutrientes, a exaustão do precursor ou o acúmulo de componentes tóxicos no meio (CARON *et al.*, 1994; TATICEK & SHULER, 1997).

Como estratégia para reverter parcial ou totalmente o “efeito da densidade celular” pode ser realizada a completa renovação do meio de cultura gasto com meio fresco (AGATHOS, 1996; HENSLER & AGATHOS, 1994) ou simultânea renovação do meio e suplementação de nutrientes (AGATHOS, 1996; REVEUNY *et al.*, 1993).

2.5. Cultivo celular

São várias técnicas para o cultivo de células animais como cultura em monocamada, suspensão e aderidas a partículas (microcarregadores) (RIZZO *et al.*, 1983).

As culturas em monocamadas são culturas onde as células aderem a uma superfície sólida e usa-se meio de cultura líquido. Para células de inseto S2 este tipo de cultivo é realizado normalmente em frascos T. Células em suspensão podem sobreviver e proliferar sem a necessidade de estarem aderidas a um substrato. Culturas em suspensão é o método preferido para aumento de escala por ser mais fácil e de menor custo, requer menos espaço, o crescimento celular pode ser monitorado e os parâmetros ambientais podem ser controlados mais facilmente (FRESHNEY, 1994).

Células de inseto não são geralmente dependentes de ancoramento (adesão a um substrato), elas se adaptam facilmente a condições de cultura em suspensão. Para o cultivo de

células de inseto em suspensão são utilizados normalmente frascos Schott, spinners e biorreatores (DREWS *et al.* 1995; KAMEN *et al.*, 1996). O frasco spinner possui uma haste rotatória ligada a tampa do recipiente. Além disso, há a presença de braços laterais para a adição de células, troca de meio ou de gás (Figura 2.2) (DOYLE, 1998).

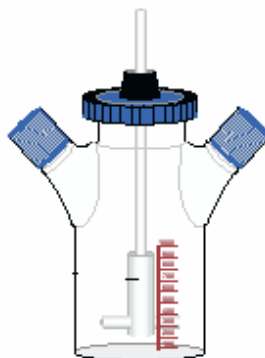


Figura 2.2. Esquema do frasco spinner para cultivo de células de inseto.

Cada forma de cultivo de células animais tem fatores que a tornam vantajosa ou desvantajosa em relação à outra. A Tabela 2.6 lista os mais importantes fatores de cada forma de cultivo.

Os biorreatores utilizados em cultura de células animais normalmente são os operados em batelada, batelada alimentada e de perfusão. O processo de perfusão é empregado há muito tempo no cultivo de células animais. São ensaios contínuos onde as células são constantemente nutridas com meio fresco.

Células de inseto S2 crescem bem tanto em cultivos em monocamada (frascos T) como em suspensão (frascos Erlenmeyers, Schotts, spinners e biorreatores) (SONDERGAARD, 1996; VALLE *et al.*, 2001; ARANTES, 2004; CHA *et al.*, 2005).

Tabela 2.6. Vantagens e desvantagens para os métodos de cultura em monocamada e suspensão.

	Vantagens	Desvantagens
Cultura em Monocamada (aderidas)	<ul style="list-style-type: none"> - Manutenção fácil e de baixo custo; - Permite uma fácil inspeção visual com o uso do microscópio invertido; - Facilidade na troca de meio de cultivo; - A razão meio/célula é mudada mais facilmente durante um experimento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Manipulação mecânica (passagens) pode diminuir a viabilidade; - Requer múltiplos frascos para expressão em larga escala; - A densidade de células é limitada devido à monocamada. Isto pode limitar a produtividade de proteína por unidade de volume de cultura celular.
Cultura em Suspensão	<ul style="list-style-type: none"> - Facilita o aumento de escala de expressão de proteínas; - Requer menos espaço; - Mais alta densidade de células. Isto pode aumentar a produtividade volumétrica de cultura celular; - Maior oxigenação e manipulação mínima podem aumentar a viabilidade. As viabilidades são normalmente maiores que 98%; - Células S2 não requerem adaptação e prontamente passam de culturas aderidas à suspensão e vice-versa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer spinners, incubadoras. O <i>start up</i> pode ser de maior custo; - Requer diariamente a contagem de células e determinação da viabilidade para seguir padrões de crescimento; - Pode ser difícil manter a esterilidade.

Fonte: Adaptado de Growth and Maintenance of Insect Cells Lines. Insect Cell Lines – Invitrogen Life Technologies (2002).

SONDERGAARD (1996), trabalhando com as células *Drosophila melanogaster* linhagem S2 analisou o crescimento da célula em alta densidade ($5,7 \times 10^7$ células/mL) em cultivos em batelada e em batelada alimentada. Usando meio Schneider's suplementado com 10% FBS, os autores obtiveram um rendimento de $1,7 \times 10^7$ células/mL, operando o biorreator em batelada alimentada, enquanto que no cultivo em batelada o rendimento foi de $8,3 \times 10^7$ células/mL. Estudos realizados por VALLE *et al.* (2001) com as células *Drosophila*

melanogaster recombinante S2 para produção da proteína menin humana usando um biorreator de 10 L operando em batelada alimentada obtiveram uma concentração celular final de $1,2 \times 10^7$ células/mL. O alto rendimento obtido com as células de inseto S2 e rS2 demonstra a viabilidade desse processo em biorreatores.

2.6. O estado fisiológico da célula

O termo estado fisiológico é quantificado por um vetor composto de várias variáveis de processo que fornecem informações significativas sobre o estado celular. Estas variáveis podem ser selecionadas entre diferentes classes, incluindo velocidades metabólicas específicas, razões entre velocidades metabólicas e outras.

A eficiência do bioprocessamento é fortemente influenciada por mudanças no estado celular, o qual deve ser monitorado, interpretado e, se possível, propriamente manipulado. O monitoramento e controle da fisiologia celular são considerados as questões mais desafiadoras da engenharia de processo moderna. (KONSTANTINOV, 1996).

O ponto central do processo de otimização é o estudo das interações entre células e os componentes químicos, bioquímicos e físicos do ambiente da cultura, e o impacto destes fatores na produtividade da proteína, na proliferação e morte das células. Entretanto a determinação do total de células e sua viabilidade estão entre as mais importantes medidas durante ambas as fases, de crescimento e de produção, em cultivos com células de inseto (AGATHOS, 1996).

2.6.1. Morte celular

Previamente, como com a maioria das áreas de pesquisa biológica, o termo necrose foi usado constantemente por cientistas da cultura de células para designar morte celular. Entretanto, pesquisas demonstram que muitas das linhagens de células de mamífero e linhagens de células de inseto, que são usadas na produção de proteínas recombinantes em escala industrial submetem-se realmente à morte programada (apoptose) no ambiente do biorreator (AL-RUBEAI & SINGH, 1998; COWGER *et al.*, 1998; MENESES-ACOSTA *et al.*, 2001). Fatores como o consumo total dos nutrientes chave (aminoácidos, glicose, soro, oxigênio), e o uso de sistemas baseado em vírus para expressão da proteína e de agentes citostáticos foram identificados como potenciais indutores de apoptose em culturas industriais, limitando assim a duração da cultura e a produtividade (SINGH *et al.*, 1994; SIMPSON *et al.*, 1997; GOSWAMI *et al.*, 1998; SIMPSON *et al.*, 1998).

2.6.2. Necrose e apoptose

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

A necrose é claramente visível por microscopia eletrônica: a célula incha e as organelas do citoplasma, em particular as mitocôndrias, são danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Tais lesões impedem o controle do equilíbrio interno: a água e alguns íons (em especial sódio e cálcio), normalmente bombeados para fora, fluem livremente

para dentro da célula, que incha e se rompe. A ruptura libera no tecido vizinho o conteúdo celular, rico em proteases e substâncias danosas (ABASTADO, 1996).

O termo apoptose foi criado para descrever somente as mudanças morfológicas que ocorrem durante a morte celular. Durante a apoptose as células encolhem drasticamente, a membrana plasmática e o retículo endoplasmático formam vacúolos, a cromatina é condensada ao longo da membrana nuclear, depois forma esferas em formas crescentes. Subseqüentemente a célula é fragmentada em estruturas membranosas compactas chamadas de corpos apoptóticos. Como já foi mencionado no item 2.6.1, inúmeras são as causas relacionadas às células apoptóticas no biorreator. SINGH *et al.* (1996) lista em seu trabalho as principais causas que induzem apoptose em culturas de células e seus níveis de importância (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Fatores indutores de apoptose em cultivo de células animais (SINGH *et al.*, 1996).

Tipos de estresses	Nível de apoptose
Esgotamento do soro	Muito Alto
Esgotamento de glicose	Muito Alto
Esgotamento da glutamina	Muito Alto
Oxigênio baixo	Muito Alto
Oxigênio alto	Alto
Nível moderado de estresse hidrodinâmico	Moderado
Alto nível de estresse hidrodinâmico	Nenhum
Alta concentração de amônia	Baixo

A Figura 2.2 demonstra a diferença entre os dois processos: necrose e apoptose. A expressão de vários genes tem sido associada à indução de morte celular em bioprocessos com células animais. Há um grande interesse em definir quais são os genes que bloqueiam e os que ativam a morte celular programada. A relação entre estes genes e as principais vias de sinalização celular envolvidas neste processo tem como finalidade futuras aplicações práticas nos cultivos de células animais e também na terapia de doenças como tumores malignos.

Em relação à célula de *Drosophila melanogaster* foram identificados alguns genes que podem causar apoptose:

- Gene *reaper* (*rpr*): controla a morte celular programada apoptótica. Experimentos demonstraram que o gene *rpr* é transcrito no início da morte das células sendo, portanto, necessário neste processo (WHITE *et al.*, 1995; ABRAMS, 1999).
- Gene *hid* (*Head Involution Defective* = Defeito da involução da cabeça): este gene é expresso no embrião e durante o desenvolvimento do olho de *Drosophila* e parece ser um regulador positivo de morte celular (ABRAMS, 1999).

Entretanto, para cultivo de células de inseto as pesquisas estão focadas em determinar os fatores-chaves que possam estar associados ao aparecimento de apoptose no biorreator sem estar relacionado ao gene.

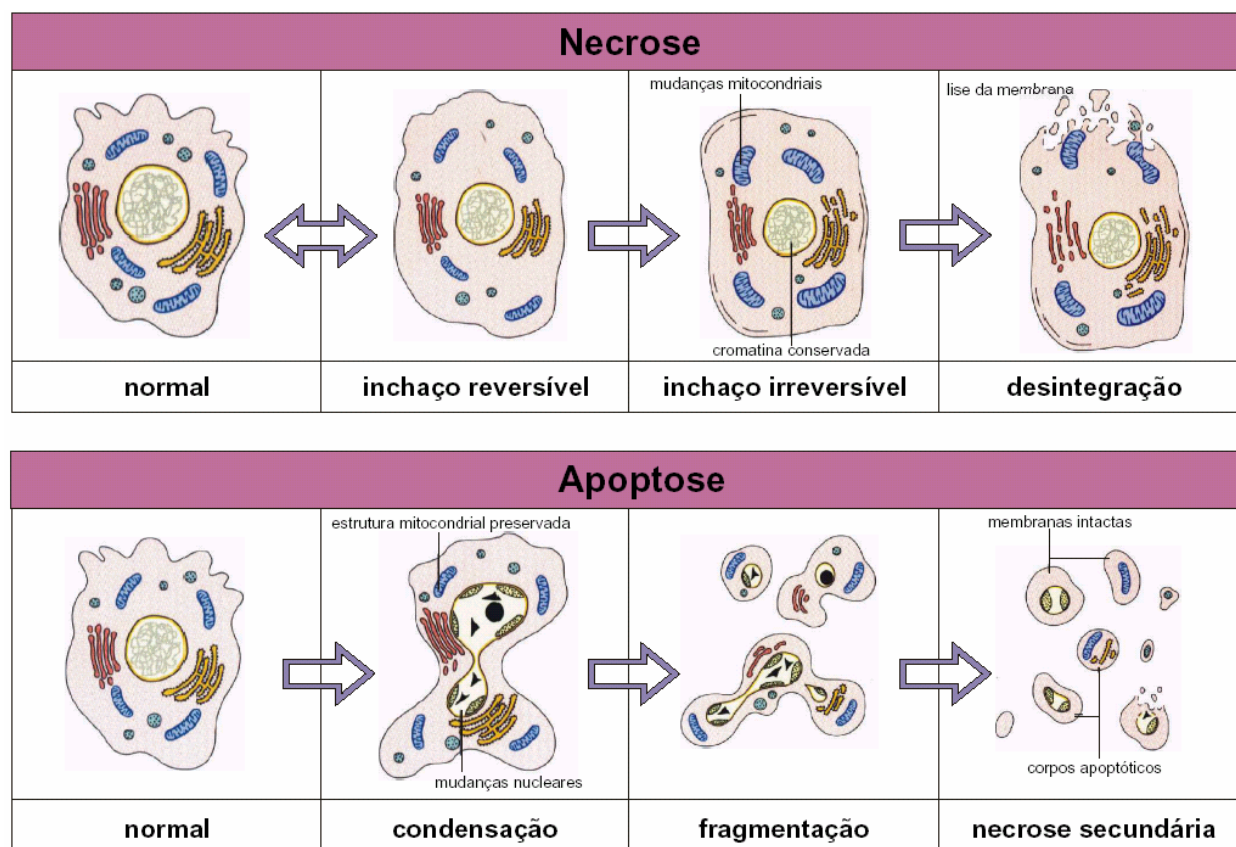


Figura 2.2. Esquema geral da diferença entre apoptose e necrose em células animais (BioAgency, 2004).

2.7. Consumo de nutrientes por células de insetos

O conhecimento do metabolismo da célula de inseto é vital para desenvolvimento de novos meio de cultura e produção de proteínas recombinantes. STAVROULAKIS *et al.* (1991) estudando culturas de células de inseto Bm-5 em meio IPL-41 suplementado com 10% de soro fetal bovino concluíram que os açúcares, incluindo glicose, frutose e sacarose juntamente com o aminoácido glutamina são consumidos pelas células.

BÉDARD *et al.* (1993) trabalhando com as linhagens de células Sf-9 e BTI-EAA verificaram que estas linhagens utilizam maltose e frutose, mas não sacarose. A glicose, frutose e maltose são usadas como fontes de carbono (REUVENY *et al.*, 1992 *apud*

IKONOMOU *et al.*, 2003) e a frutose é consumida somente depois da exaustão da glicose (BÉDARD *et al.*, 1993). Entretanto, o carboidrato que é considerado mais importante para o crescimento da célula de inseto Sf-9 é a glicose (BÉDARD *et al.*, 1997; DREWS *et al.*, 1995; MENDONÇA *et al.*, 1999). Glicose foi identificada como sendo a fonte de energia e fonte de carbono preferida (DREWS *et al.*, 1995).

No estudo realizado por IKONOMOU *et al.* (2004) com a linhagem de inseto High-Five™ verificou-se que a queda de viabilidade coincide com a exaustão da glicose. Entretanto, em alguns trabalhos observou-se que o excesso de glicose reduz o rendimento celular e acúmulo de subprodutos, tais como alanina (MENDONÇA *et al.*, 1999; IKONOMOU *et al.*, 2004).

Aminoácidos como glutamina, glutamato, aspartato, serina, arginina, asparagina e metionina são usados para produção de energia (DREWS *et al.*, 1995). A maioria destes aminoácidos não é sintetizada por células de inseto. A suplementação dos aminoácidos metionina e tirosina foram usadas para retardar a morte celular em cultura de células de inseto, verificando-se que suplementação de glutamina no meio de cultivo pode afetar a velocidade de crescimento de células de inseto Sf-9 (MENDONÇA *et al.*, 1999).

2.8. Acúmulo de subprodutos no cultivo de células de inseto

A cultura de células de inseto em larga escala é afetada por vários fatores-chaves que incluem o fluxo contínuo no biorreator, resistência à transferência de massa no transporte de nutrientes, parâmetros biofísicos e biológicos que controlam o crescimento das células.

As células alteram o ambiente do meio de cultura pela remoção de nutrientes e adição de produtos e subprodutos, que são produtos liberados do metabolismo como o lactato e a amônia que são tóxicos para as células (VAN DER POL & TRAMPER, 1998).

Os acúmulos destas moléculas juntamente com o esgotamento de nutrientes causam a paralisação do crescimento e o declínio da viabilidade celular (CARTWRIGHT, 1994). Contudo, em culturas de células de inseto não ocorre acúmulo significativo de amônia e lactato durante a fase de crescimento (BÉDARD *et al.*, 1993; RADFORD *et al.*, 1997; RHIEL *et al.*, 1997; MENDONÇA *et al.*, 1999).

STAVROULAKIS *et al.* (1991) estudando a produção de amônia durante o cultivo das células de inseto Bm-5 observaram que a mesma foi consumida no meio de cultura acompanhada de um acúmulo de ácido úrico sugerindo que a amônia é convertida para ácido úrico. Contudo, um estudo realizado por DONALDSON *et al.* (1999) demonstrou o efeito negativo da amônia na produção da proteína SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) pela célula *Trichoplusia ni*.

Os subprodutos podem estar relacionados à adição de nutrientes requeridos pelas células. Esta adição pode ter efeito negativo na densidade celular, pois o metabolismo do inseto resulta na formação de subprodutos que podem ter um efeito inibidor na atividade metabólica da célula. STAVROULAKIS *et al.* (1991) observaram que o excesso de glutamina no meio de cultivo resultou em uma baixa densidade celular, devido provavelmente ao alto nível de lactato encontrado no meio.

2.9. Oxigênio no cultivo

O oxigênio é considerado essencial na cultura de célula animal e, portanto, deve ser considerado como um nutriente do meio de cultura. O controle da concentração de oxigênio dissolvido (OD) assegura que o crescimento célula não seja limitado pelo oxigênio e que a

formação de radicais livres, especialmente prejudiciais para células animais, é evitada (KAMEN *et al.*, 1995; AGATHOS, 1996; SCHMID, 1996).

JIAO *et al.* (1997) trabalharam com células de insetos da linhagem Sf-21 em frasco spinner modificado com 500 mL de volume de trabalho para estimar *on line* a taxa de respiração. Realizaram dois testes, em experimento em batelada com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (OD), a 10% e 50% de saturação de ar. Na concentração 10% de OD o oxigênio mostrou-se um fator limitante para cultivo da célula Sf-21, pois a máxima concentração celular foi de apenas $1,80 \times 10^6$ células/mL e a velocidade máxima de consumo de oxigênio de 0,289 mmol/L.h em 108 h. Com 50% de OD a densidade celular foi de 7×10^6 células/mL e a velocidade máxima de consumo de oxigênio alcançada de 0,593 mmol/L.h em 132 h. Os autores do trabalho ainda enfatizam a importância da velocidade de consumo de oxigênio para a determinação do estado fisiológico da Sf-21.

RHEIL e MURHAMMER (1995), buscando um melhor entendimento do efeito da concentração de OD no metabolismo das células de inseto, investigaram efeitos da oscilação da concentração de OD no metabolismo da célula de inseto. O trabalho foi desenvolvido utilizando a célula de *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21-AE e biorreator com capacidade 3 L (operando com volume de 1,4 L). As características dos ensaios estão resumidas na Tabela 2.8. Os ensaios consistiram em ciclos de 30 min a 15% de saturação de ar, seguido de 30 min de anoxia. Para uma condição constante de oxigênio dissolvido (Tabela 2.8 e ensaio G9) a velocidade específica de crescimento celular foi de $0,022 \text{ h}^{-1}$, enquanto que para uma condição de oscilação de oxigênio dissolvido (Tabela 2.8 e ensaio G10) ocorreu uma redução significativa na velocidade específica de crescimento celular de $0,0098 \text{ h}^{-1}$. Os resultados demonstraram claramente que a célula exposta a esta oscilação de concentração de OD com

período de anoxia e concentração de oxigênio dissolvido insuficiente afeta significativamente o metabolismo da célula e conseqüentemente o crescimento celular.

Tabela 2.8. Características dos experimentos no biorreator para investigar o efeito da oscilação da concentração do oxigênio dissolvido (RHEIL & MURHAMMER, 1995).

Número do ensaio	Características do ensaio
G9	OD constante a 15%
G10	OD oscilando entre 15% e 0% desde 32 h até o fim do ensaio; fluxo descontínuo de nitrogênio a 0% de OD, período de anoxia “aparentemente”.
G11	OD oscilando entre 15% e 0% desde 56 h para 131 h; OD constante a 15% desde 131 h até o fim do ensaio; fluxo descontínuo de nitrogênio a 0% de OD, período de anoxia “Verdadeiro”.
G15	OD oscilando entre 15% e 0% desde 53 h para 115 h; OD constante a 15% desde 115 h até o fim do ensaio; fluxo descontínuo de nitrogênio a 0% de OD, período de anoxia “Verdadeiro”.

GOTOH *et al.* (2002) analisaram a dependência da velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}) das células de inseto Sf-9. Para regiões de alta concentração de OD os valores de Q_{O_2} se mantêm constantes, mas os valores decrescem rapidamente com o decréscimo de OD na região de baixa concentração. Geralmente a variação de Q_{O_2} com a concentração de oxigênio dissolvido é descrita com uma cinética do tipo Monod ilustrada na Equação 2.1.,

$$Q_{O_2} = \frac{Q_{O_2 \max} \times C_{O_2}}{K_S + C_{O_2}} \quad (2.1)$$

onde Q_{O_2max} é velocidade específica máxima de consumo de oxigênio, K_S é a constante de saturação e C_{O_2} é concentração de oxigênio dissolvido. Os ensaios demonstraram que a concentração OD crítico para células Sf-9 foi de 2,5% da saturação e sua constante de saturação K_S foi 2,0 μM com velocidade específica máxima de respiração Q_{O_2max} de 0,62 $\mu\text{mol}/10^6$ células.h.

As velocidades específicas de consumo de oxigênio (Q_{O_2}) para as células de inseto são similares as células de mamíferos, variando de 0,08 a 0,48 $\text{mmolO}_2/10^9$ célula.h para células as de inseto comparadas com as células de mamífero que varia de 0,023 a 0,54 $\text{mmolO}_2/10^9$ célula.h (SCHIMD, 1996; RUFFIEUX *et al.*, 1998).

Entretanto, alguns fatores como densidade do inóculo e temperatura podem influenciar na velocidade específica de consumo de oxigênio. GOTOH *et al.* (2004) demonstraram que a densidade celular do inóculo não provoca mudança significativa na velocidade de consumo de oxigênio das células de inseto Sf-9, mas a diminuição da temperatura provoca um decréscimo na velocidade específica máxima de consumo de oxigênio e na constante de saturação.

2.10. Comentários gerais

Os vários tópicos abordados nesta revisão bibliográfica proporcionaram uma idéia dos vários fatores que podem influenciar no cultivo das células de inseto.

Apesar do grande número de pesquisas realizadas com células de inseto, a maioria está relacionada aos cultivos das células de insetos de *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni*. No que diz a respeito ao cultivo utilizando células de inseto de *Drosophila melanogaster*, poucos trabalhos foram realizados, dentre os quais se podem destacar os

trabalhos de SONDERGAARD (1996) e VALLE *et al.* (2001). Ambos os trabalhos analisaram apenas a viabilidade do cultivo das células S2 e rS2 em biorreator sem definir parâmetros fisiológicos como consumo de nutrientes e velocidade específica de respiração celular, os quais são fundamentais para desenvolvimento do bioprocesso.

Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com as células de inseto S2 e rS2 a fim de se avaliar as possíveis mudanças ocorridas no metabolismo das células devido à modificação genética realizada nas células e determinar parâmetros que permitam o desenvolvimento deste bioprocessos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Células utilizadas

Foram utilizadas duas linhagens de célula *de Drosophila melanogaster*, a linhagem selvagem *Drosophila melanogaster* Schneider-S2 (SCHNEIDER, 1972) e a linhagem recombinante *Drosophila melanogaster* Schneider-rS2 GPV (Glicoproteína do vírus da raiva ou *rabies vírus glycoprotein*) ambas as linhagens foram cedidas pelo Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan de São Paulo.

3.1.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o meio comercial livre de soro Sf-900 II SFM da Gibco. Na Tabela 3.1 estão representadas as concentrações de alguns componentes identificados em trabalhos que utilizaram o meio Sf-900 II, uma vez que a composição deste meio não é disponibilizada pelo fabricante.

3.1.3. Corantes para determinar viabilidade celular

Foi utilizada uma solução aquosa de 0,4% azul de Tripán (Trypan Blue) (Sigma T-6146), como corante para método de exclusão de corante para acompanhar a viabilidade celular durante os cultivos.

Também foram utilizados os corantes fluorescentes: Brometo de Etídio ($C_{21}H_{20}N_3Br$) e Laranja de Acridina ($C_{17}H_{20}ClN_3 \cdot 1/2ZnCl_2$), da marca Sigma, na análise de células apoptóticas pelo método da fluorescência .

Tabela 3.1 Concentração de componentes identificados em trabalhos que utilizaram o meio Sf-900 II.

Componentes	Concentração (g/L)	Referência
Carboidratos		
Glicose	9,73-10,0	RHIEL <i>et al.</i> (1997); ARANTES <i>et al.</i> (2004)
Trealose	1,00	MARQUES (2005)
Aminoácidos		
Glutamina	2,18	RHIEL <i>et al.</i> (1997)
Asparagina	1,65	RHIEL <i>et al.</i> (1997)
Glutamato	1,66	ARANTES (2004)
Serina	0,89	ARANTES (2004)
Glicina	1,00	ARANTES (2004)
Histidina	0,61	ARANTES (2004)
Arginina	0,60	ARANTES (2004)
Treonina	0,18	ARANTES (2004)
Alanina	0,45	ARANTES (2004)
Prolina	0,55	ARANTES (2004)
Tirosina	0,23	ARANTES (2004)
Valina	0,62	ARANTES (2004)
Metionina	0,82	ARANTES (2004)
Cisteína	0,031	ARANTES (2004)
Isoleucina	0,53	ARANTES (2004)
Leucina	0,34	ARANTES (2004)
Fenilalanina	0,85	ARANTES (2004)
Lisina	0,59	ARANTES (2004)

3.1.4. Solução tampão salina

A solução tampão (pH 7,4) da marca Cultilab, apresentando a composição para 1 L que está representada na Tabela 3.2. A solução foi utilizada para diluir a concentração celular da amostra retirada do cultivo com a finalidade de fazer a contagem de células.

Tabela 3.2. Composição da solução tampão salina.

Composto	Quantidade(g)
NaCl	80,0
KCl	2,0
Na ₂ HPO ₄	11,5
KH ₂ PO ₄	2,0

3.1.5. Equipamentos

3.1.5.1. Câmara asséptica

Foi utilizado câmara asséptica de fluxo laminar Sterilgard III, classe II da Baker Company (USA), contendo lâmpada germicida UV, em todas as etapas nas quais eram manipuladas as células.

3.1.5.2. Microscópio

Para a contagem de células e determinação da viabilidade por exclusão de corante foi utilizado o microscópio de campo invertido da marca Olympus modelo CK3.

O microscópio óptico Olympus BX 50 (campo direto), acoplado a uma câmera de vídeo SONY CCD-Iris DXC-107A com placa de aquisição de imagens vídeo modelo Blaster, foi utilizado para obter imagens da cultura para quantificar células necróticas e apoptóticas através do método de fluorescência.

3.1.5.3. Autoclave

As vidrarias e demais utensílios envolvidos na realização dos cultivos de células foram esterilizados em autoclaves da marca FABBE LTDA, por 25 minutos a 121°C.

3.1.5.4. Frasco Schott modificado

Um frasco do tipo Schott de 250 mL (vide Figura 3.1) foi modificado para a realização dos experimentos de cultivos envolvendo células de inseto S2. A modificação foi feita na tampa do frasco Schott, onde foi incorporado um eletrodo de oxigênio dissolvido

autoclavável, para monitoramento da concentração de oxigênio no meio de cultivo e uma entrada de ar e saída de gás com filtros acoplados para evitar contaminação do cultivo.

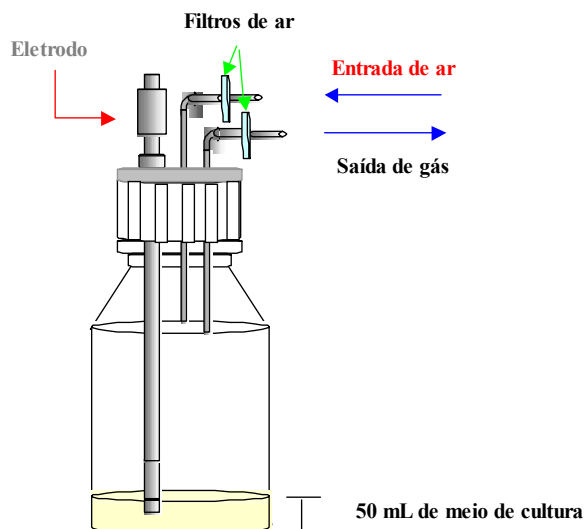


Figura 3.1. Representação esquemática do frasco Schott modificado para realização de cultivo envolvendo as células de inseto S2.

3.1.5.5. Câmara de incubação rotatória

Foi utilizado em todas as etapas de cultivos o incubador rotatório (shaker) marca Superohm. Um suporte foi acoplado na parte interna do equipamento com capacidade para 8 frascos T de 25 cm², uma vez que os frascos T de cultura não devem ser agitados e, no entanto, devem ter sua temperatura controlada.

3.2. Procedimento experimental para o cultivo de células

O seguinte procedimento foi seguido nos cultivos com células de inseto S2.

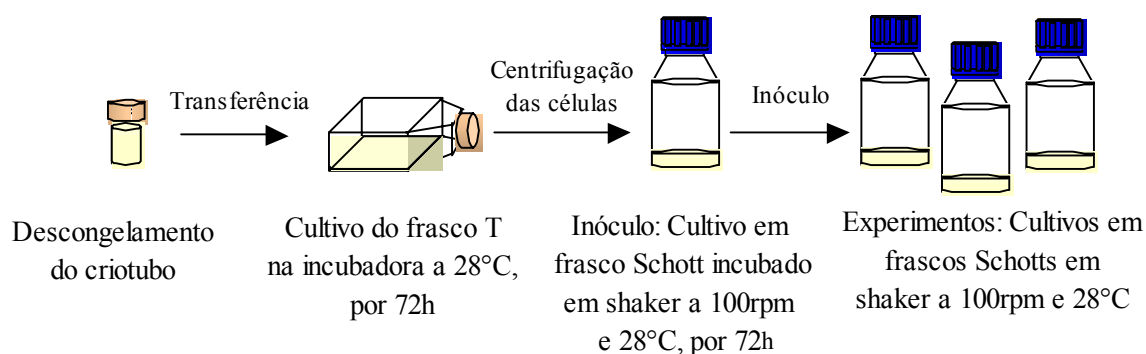


Figura 3.2. Representação esquemática do procedimento seguido nos experimentos de cultivos das células inseto S2.

As células estocadas em nitrogênio líquido (-196°C) foram ativadas e, depois de recuperar sua atividade normal, foram inoculadas em 5 mL de meio Sf-900 II em frasco T de 25 mL de capacidade. O meio de cultura (normalmente conservado em geladeira, aproximadamente 4°C) usado nos cultivos foi levado à temperatura ambiente (25°C) antes do uso.

As células foram colocadas para incubação em frasco T à temperatura de 28°C sem agitação. Depois de incubadas durante 3 dias para que pudessem recuperar completamente sua atividade normal, a seguir as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio novo e em seguida foram transferidas para frasco Schott de 100 mL contendo 15 mL de meio Sf-900 II para o preparo do inóculo. O frasco Schott foi colocado para incubação no Shaker a temperatura de 28°C e rotação de 100 rpm. Após 72 horas um volume de meio contendo células suficientes foi transferido para inocular o frasco Schott do experimento com uma concentração inicial entre 4×10^5 a $5,5 \times 10^5$ células/mL. A seguir, foram retiradas diariamente amostras de 0,1 mL, através de micropipetas para fazer as determinações da concentração celular através de método de contagem por exclusão de corante.

3.3. Avaliação de métodos para análise de viabilidade

3.3.1. Determinação da concentração e viabilidade celular

As contagens de células foram realizadas pelo através do método de exclusão de corante azul de Tripán (Trypan Blue Sigma) (FRESHNEY, 1994). Neste método as concentrações de células viáveis e não viáveis foram determinadas pela contagem em câmara de Neubauer. Era retirada alíquota de 0,1 mL de cada frasco Schott, a qual era diluída com 0,9 mL de solução tampão salina, totalizando 1 mL de amostra diluída. Em seguida retirava-se 90 μ L da amostra diluída e acrescentavam-se 10 μ L de uma solução etílica 0,4% de azul de Tripán, completando um volume 100 μ L. Com ajuda de uma micropipeta colocava-se uma alíquota de 10 μ L da amostra corada na câmara de Neubauer. A contagem era realizada em microscópio OLYMPUS CK3, utilizando a objetiva de 10x.

A concentração total das células era dada pela somatória do número de células não coradas (viáveis) mais o número de células coradas (não viáveis) e multiplicado pelo fator de diluição (Equação 3.1).

Cálculo:

Concentração total de células:

$$(n_v + n_d) \times D \times 10^4 = \text{células/mL} \quad (3.1)$$

Concentração de células viáveis:

$$n_v \times D \times 10^4 = \text{células viáveis/mL} \quad (3.2)$$

Porcentagem de células viáveis:

$$\frac{n_v}{n_v + n_d} \times 100 = \% \text{ células viáveis} \quad (3.3)$$

Onde: n_v = número total de células viáveis

n_d = número total de células não viáveis

D = fator de diluição para células S2: $D = 10/9$

3.3.2. Quantificação de apoptose e viabilidade celular usando corantes fluorescentes

A distribuição das células necróticas e apoptóticas na cultura foi determinada com base no protocolo utilizado por MERCILLE *et al.* (1994).

Uma amostra de célula em suspensão era misturada com corantes fluorescentes que aderem ao ADN (Ácido Desoxirribonucléico) e examinada em microscópio fluorescente para visualizar a contagem de células com organização anômala da cromatina.

Uma solução da mistura de corante de 100 $\mu\text{g/mL}$ de laranja de acridina (AO) e 100 $\mu\text{g/mL}$ brometo de etídio (EB) era preparada com em solução tampão salina livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Um volume de 4 μL de esta mistura de corante foi adicionado a uma amostra de 100 μL de suspensão de células contendo 5×10^5 a 5×10^6 células/mL.

Após adição da solução do corante a amostra, a câmara de Neubauer foi preparada e examinada no microscópio BX50 Olympus (Melville, NY) com uma objetiva de 40x de magnificação e a combinação de filtros: faixa de excitação 470-490 nm; emissão de 515 nm.

O laranja de acridina atravessa a membrana das células viáveis e não viáveis. O corante reage com a cromatina, formando um composto esverdeado.

O brometo de etídio somente atravessa a membrana das células não viáveis (não pode atravessar a membrana intacta da célula viável). Este, interagindo com a cromatina, gerando um composto laranja-vermelho.

Foram contadas, no mínimo 200 células por amostra, registrando o número de células de cada amostra seguindo a classificação do estado celular utilizada originalmente por MERCILLE *et al.* (1994):

- (i) VNA: células viáveis com núcleo não apoptótico;
- (ii) VA: células viáveis com núcleo apoptótico;
- (iii) NEC: células necróticas, células não viáveis com núcleo normal;
- (iv) NVA: células não viáveis com núcleo apoptótico;
- (v) CF: células livres de cromatina.

A porcentagem de cada estado celular em relação ao total de células foi obtida da seguinte maneira, similarmente para os outros quatro estados celulares:

$$\%VNA = (VNA / (VNA + VA + NEC + NVA + CF)) \times 100 \quad (3.4)$$

3.4. Avaliação da influência do inóculo no crescimento das células S2

Para os experimentos onde foram avaliados os efeitos do inóculo no cultivo das células de inseto S2 foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 (4 experimentos + 2 pontos centrais) objetivando as quantificações dos efeitos das variáveis independentes concentração do inóculo e idade do inóculo na variável dependente velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}). Os níveis das variáveis independentes foram de $2,5 \times 10^5$ e $7,5 \times 10^5$ células/mL para a concentração de inóculo e 48 e 96 horas para a idade do inóculo.

Os resultados obtidos de concentração celular em função do tempo nos experimentos foram analisados através de softwares Origin 5.0 e Statistic 5.0, podendo assim traçar os gráficos dos resultados obtidos.

A partir dos gráficos foi possível determinar:

- Velocidade específica máxima de crescimento celular: $\mu_{m\acute{a}x}$
- Produtividade máxima em células: $P_{m\acute{a}x}$

Para a determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular podemos considerar-se a seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.5)$$

onde: μ é a velocidade específica de crescimento celular; X é a concentração de células e t é tempo de cultivo.

Na região exponencial de crescimento da célula tem-se que:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = cte = \mu_{m\acute{a}x} \quad (3.6)$$

Integrando a equação anterior na fase exponencial,

$$\ln X = \ln X_i + \mu_{m\acute{a}x} \times (t - t_i) \quad (3.7)$$

onde o índice i indica o início da fase exponencial e o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ é o coeficiente angular do gráfico $\ln X$ versus t .

A produtividade máxima de células de uma cultura é uma medida do número de células produzidas por volume de cultura e por unidade de tempo que permite avaliar o desempenho de um bioprocessos (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Essa produtividade pode ser determinada traçando uma linha a partir da origem, tangenciando o gráfico da concentração de células versus tempo, no ponto de maior inclinação, como indicado na Figura 3.3.

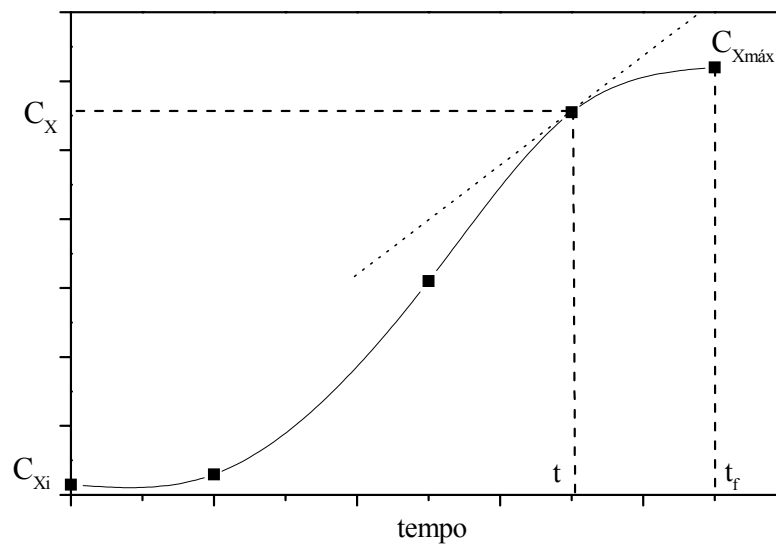


Figura 3.3. Exemplo de gráfico para determinação da produtividade máxima de células.

Essa produtividade máxima em células pode ser determinada através da equação:

$$P_{máx} = \frac{C_X - C_{Xi}}{t} \quad (3.8)$$

onde: C_X é a concentração de células no tempo t , C_{Xi} é a concentração de células inicial e t tempo de cultivo para se atingir a concentração de célula C_X .

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Concentração de glicose e aminoácidos

As concentrações de glicose e glutamina no sobrenadante do cultivo foram realizadas enzimaticamente usando o YSI *Biochemical Analyzer* modelo 2700 (Yellow Spring Instruments). As concentrações de aminoácidos foram determinadas pelo sistema Pico-tag usando uma coluna de água de fase reversa HPLC marca Waters.

3.5.2. Medida da transferência de oxigênio

Para determinação do k_La (coeficiente volumétrico de transferência de O_2) foi utilizado o método dinâmico descrito por SCHMIDELL *et al.* (2001).

O método consiste em inicialmente borbulhar nitrogênio no líquido, a fim de eliminar todo o O_2 dissolvido, até que o eletrodo indique o valor zero.

A seguir, inicia-se a aeração e a agitação do meio líquido, nas condições em que se pretende obter o valor de k_La , passando-se então a registrar o sinal do eletrodo. O sinal sai do valor zero e aumenta até atingir a saturação.

Nessas condições a Equação 3.9 do balanço da concentração de oxigênio dissolvido, pode ser integrada, conhecendo-se condição inicial ($t = 0$; $C = 0$), pois é possível separar as variáveis:

$$\frac{dC}{dt} = k_La \cdot (C_s - C) \quad (3.9)$$

Integrando, obtém-se:

$$\ln\left(\frac{C_s}{C_s - C}\right) = k_La \cdot t \quad (3.10)$$

onde o C_s concentração de saturação O_2 dissolvido no líquido e o valor de k_La é o coeficiente

angular do gráfico $\ln\left(\frac{C_s}{C_s - C}\right)$ versus t .

3.5.3. Método para determinação Q_{O_2}

As determinações das velocidades específicas de respiração (Q_{O_2}) foram feitas pelo método dinâmico. Com o eletrodo de oxigênio dissolvido imerso no meio de cultivo com células, num dado instante (t_0) interrompeu-se a alimentação de ar no frasco Schott, com o intuito de anular a transferência de oxigênio. Neste instante foi desligada agitação do shaker, a fim de reduzir ao máximo a transferência de O_2 na superfície do líquido. A resposta do eletrodo era quase imediata, sendo o processo representado pela Figura 3.4 que segue:

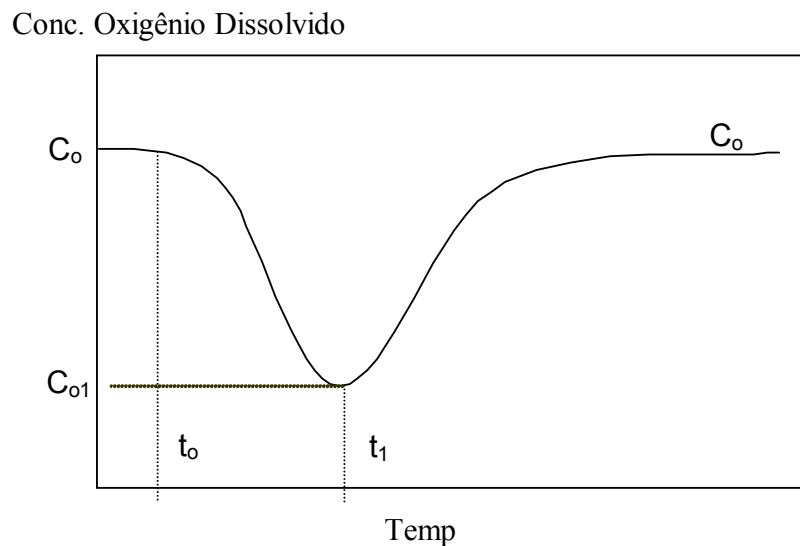


Figura 3.4. Variação da concentração de O_2 dissolvido com tempo durante a utilização do método dinâmico para determinar Q_{O_2} .

Como se observa na Figura 3.4, depois da interrupção da agitação a concentração de oxigênio dissolvido inicial (C_0) começa a diminuir. Ao se atingir um certo valor C_{01} (instante t_1), foi retomada a agitação e a aeração, nas condições que estavam sendo praticadas, observando-se então, o aumento da concentração de O_2 dissolvido até atingir novamente o valor inicial (C_0).

O procedimento demorava um tempo relativamente curto variando entre 1 a 1,5 minuto. Supondo que neste intervalo de tempo não haja mudança no sistema (concentração celular (X), metabólitos e substratos permanecem constantes), e o valor de Q_{O_2} seja mantido constante, a equação de balanço de oxigênio simplificava-se a:

$$\frac{dC}{dt} = -Q_{O_2}X \quad (3.9)$$

Devido às hipóteses assumidas, o produto $Q_{O_2}X$ deve ser constante durante este intervalo de tempo, permitindo a integração da Equação 3.8, obtendo-se:

$$C = C_0 - Q_{O_2}X(t - t_0) \quad (3.10)$$

A Equação 3.10 prevê que a partir do instante t_0 ($C = C_0$) deve ocorrer uma variação linear de C com o tempo, obtendo-se uma reta cujo coeficiente angular é igual a $(-Q_{O_2}X)$, permitindo, assim, a determinação do valor de Q_{O_2} (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.5.4. Variação do oxigênio durante o cultivo das células S2 em frasco Schott

A concentração de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo contido no frasco Schott de 250mL e 100mL foi determinada indiretamente, através da leitura dos sinais emitidos pelo eletrodo galvânico (modelo M.1016.500) e eletrodo polarográfico (modelo: 405-M3-S7/60), marca Meteller Toledo, respectivamente, conforme esquematizado na Figura 3.5. Durante todo o experimento era registrada a queda do oxigênio em relação ao tempo.

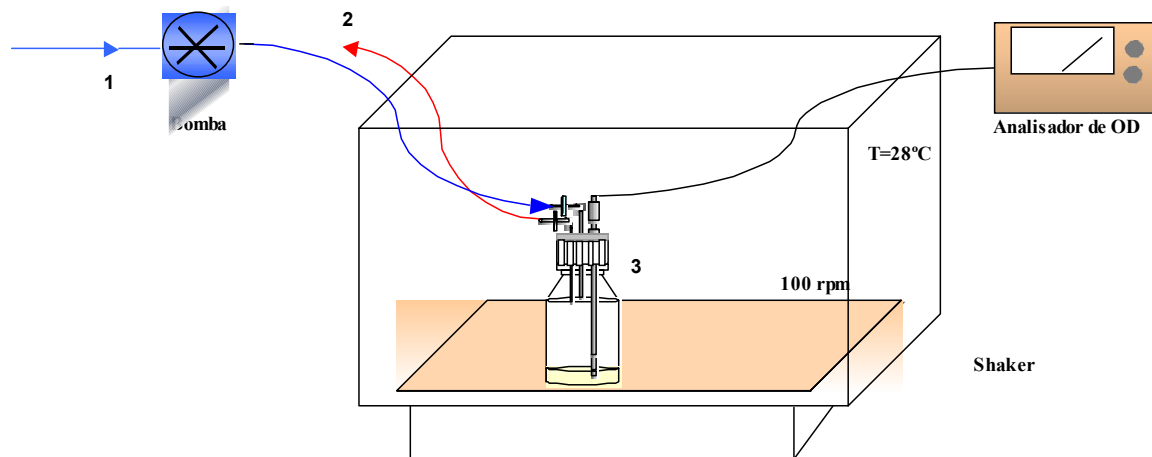


Figura 3.5. Esquema do sistema experimental utilizado para a determinação da queda do oxigênio no frasco Schott. (1) Entrada de ar; (2) Saída de gás; (3) Frasco Schott modificado.

Durante o cultivo de células em frasco Schott, efetua-se a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, enquanto que, simultaneamente, a célula consome o oxigênio dissolvido. Assim sendo, o balanço de oxigênio no meio líquido é representado pela equação que segue:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C_S - C) - Q_{O_2} X \quad (3.11)$$

A Equação 3.11 indica que a variação da concentração de oxigênio dissolvido no líquido (dC/dt) é o resultado da diferença entre as quantidades de O_2 que se consegue dissolver $k_L a \cdot (C_S - C)$ e a de oxigênio consumido pelas células $Q_{O_2} X$.

3.6. Programação e estratégia experimental seguida nesta pesquisa

Para facilitar a compreensão e a justificativa do trabalho experimental realizados nesta pesquisa são listados os 19 experimentos realizados e as respectivas características dos

mesmos. Nas Tabelas A1 a A19 do apêndice A encontram-se os valores das principais variáveis, ao longo dos cultivos.

Tabela 3.3. Experimentos realizados nesta pesquisa e suas principais características.

Experimento	Célula utilizada	Frasco Schott (mL)	Volume de trabalho(mL)	Principal objetivo
E1-S2	S2	100	20	Análise da metodologia para quantificar a viabilidade celular.
E2-rS2	rS2	100	20	Análise da metodologia para quantificar a viabilidade celular.
E3-S2	S2	100	20	Análise do consumo de aminoácidos, como substratos limitantes.
E4-rS2	rS2	100	20	Análise do consumo de aminoácidos, como substratos limitantes.
E5-S2	S2	100	20	Análise do consumo de glicose e glutamina, como substratos limitantes.
E6-rS2	rS2	100	20	Análise do consumo de glicose e glutamina, como substratos limitantes.
E 1 a E6	rS2	100	20	Análise da influência da idade e concentração do inóculo no crescimento celular.
E7-rS2	rS2	250	50	Avaliação das características de respiração das células rS2
E8-S2	S2	250	50	Avaliação das características de respiração das células S2
E9-S2	S2	250	50	Análise do excesso de oxigênio (hiperoxia)
E10-S2	rS2	250	50	Análise do crescimento celular sem oxigenação superficial.
E 11-rS2 a E14-rs2	rS2	100	20	Análise da influencia da agitação no oxigênio dissolvido e no crescimento celular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Definição de metodologia para quantificação da viabilidade das células S2

Devido à inexistência de uma metodologia consolidada para quantificar a viabilidade de células de inseto optou-se neste trabalho por fazer uma análise comparativa dos dois métodos mais comumente utilizados no âmbito de tecnologia de cultivo de célula animal, quais sejam, o método de exclusão do corante azul de Tripán (FRESHNEY, 1994) e o método que utiliza corantes fluorescentes para discriminação de células apoptóticas e necróticas (MERCILLE *et al.*, 1994). Inicialmente foram realizados experimentos utilizando as células de inseto S2 (E1-S2) e as células de inseto rS2 (E2-rS2). Ambos os experimentos em Schotts de 100 mL contendo um volume de trabalho de 20 mL de meio de cultura Sf-900 II, concentração inicial de células de 5×10^5 células/mL, a temperatura de 28°C e 100 rpm de rotação, com o objetivo de comparar a porcentagem de células viáveis identificadas pelo método de exclusão de corante e o método de corantes fluorescentes. Os resultados obtidos nos experimentos encontram-se na Figura 4.1.

Como pode ser observado na Figura 4.1 ambos os métodos, exclusão de corante e fluorescência, mostraram-se capazes de prever a porcentagem de células viáveis nos experimentos E1-S2 e E2-rS2. Entretanto, no E1-S2 pode-se observar que o método fluorescente apresentou uma tendência em antecipar a queda da viabilidade celular, pois o método é capaz de identificar as células apoptóticas. O corante fluorescente evidencia mais rapidamente a perda de viabilidade pela célula que o método de exclusão de azul de Tripán (MENESES-ACOSTA *et al.* 2001). Na Figura 4.1 pode se observar uma concentração máxima de célula de $2,55 \times 10^7$ células/mL no E1-S2, superior à concentração celular máxima

de $1,64 \times 10^7$ células/mL do E2-rS2, evidenciando que a modificação genética realizada nas células S2 alterou o crescimento celular da mesma.

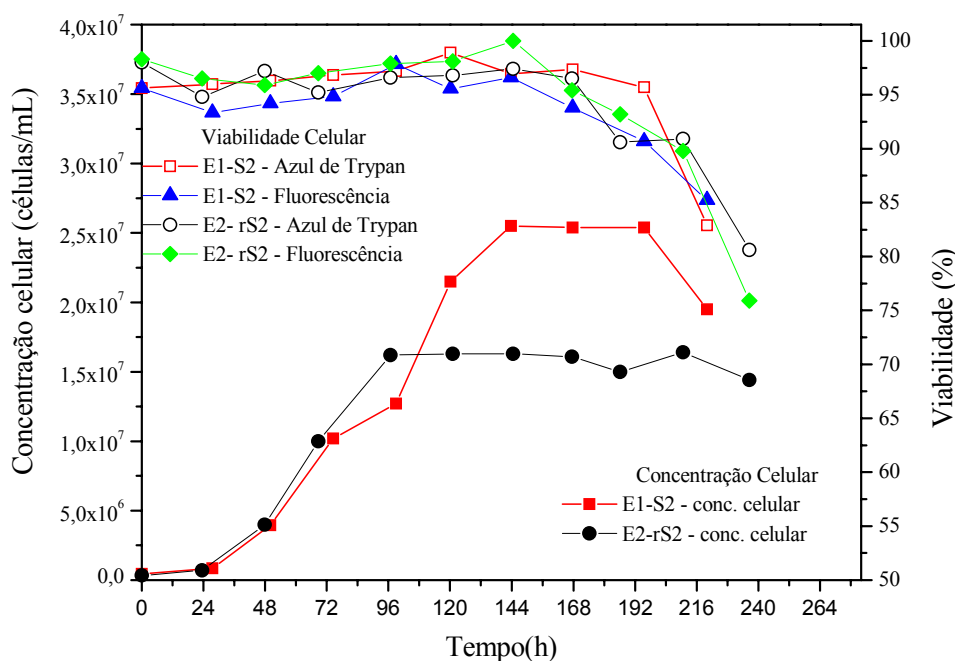


Figura 4.1. Resultados dos experimentos E1-S2 e E2-rS2 utilizando as células S2 e rS2, respectivamente, para comparação de porcentagem das células viáveis totais entre o método de exclusão corante azul de Tripán e método de fluorescência.

A evolução da porcentagem da viabilidade celular seguindo os critérios de MERCILLE *et al.* (1994) identificado pelo método de fluorescência nos experimentos E1-S2 e E2-rS2 está demonstrada nas Figuras 4.2 e 4.3. As células não viáveis apoptóticas representaram uma baixa porcentagem durante o cultivo (0,4%), e no final (0,3%) do experimento E1-S2 (Figura 4.2), entretanto, este tipo de célula não foi observado no experimento E2-rS2 com a célula recombinante, como pode ser observado na Figura 4.3.

As células livres de cromatina aparecem no início do cultivo do experimento E1-S2, entretanto o experimento E2-rS2 não apresentou este tipo de célula no início do cultivo

(Figura 4.3). O fato do experimento E1-S2 apresentar 3,6% de células livres de cromatina no início do cultivo pode ser atribuído à presença de células necróticas provenientes do inóculo (MERCILLE *et al.*, 1994), uma vez que esta porcentagem diminui durante o cultivo chegando a 0%, como pode ser observado na Figura 4.2.

Os experimentos E1-S2 e E2-rS2 não apresentaram índices elevados de células viáveis apoptóticas, 5,6% para o E1-S2 e 6,5% para o E2-rS2, respectivamente, como pode ser observado nas Figuras 4.2 e 4.3.

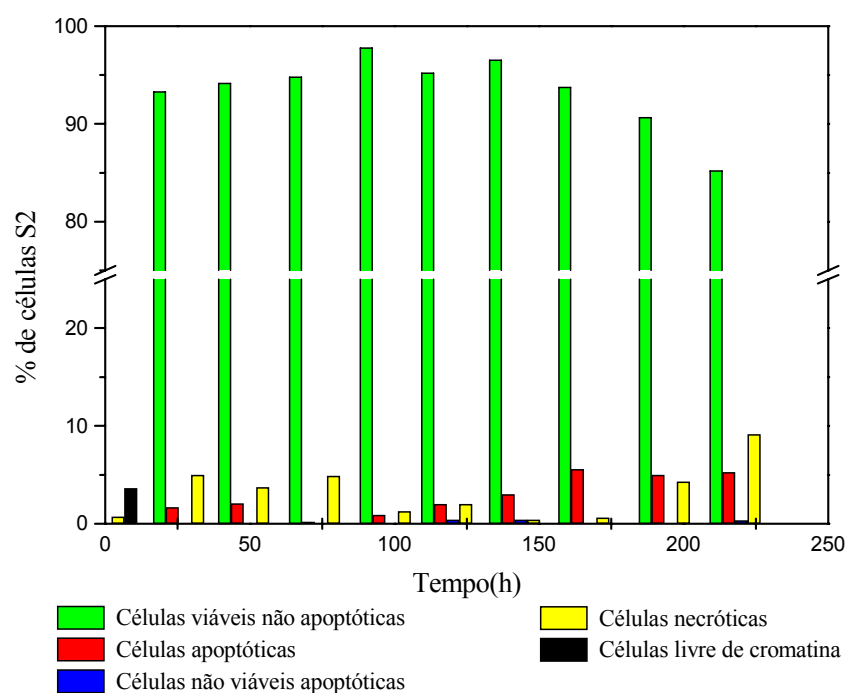


Figura 4.2. Evolução da viabilidade celular no experimento E1-S2.

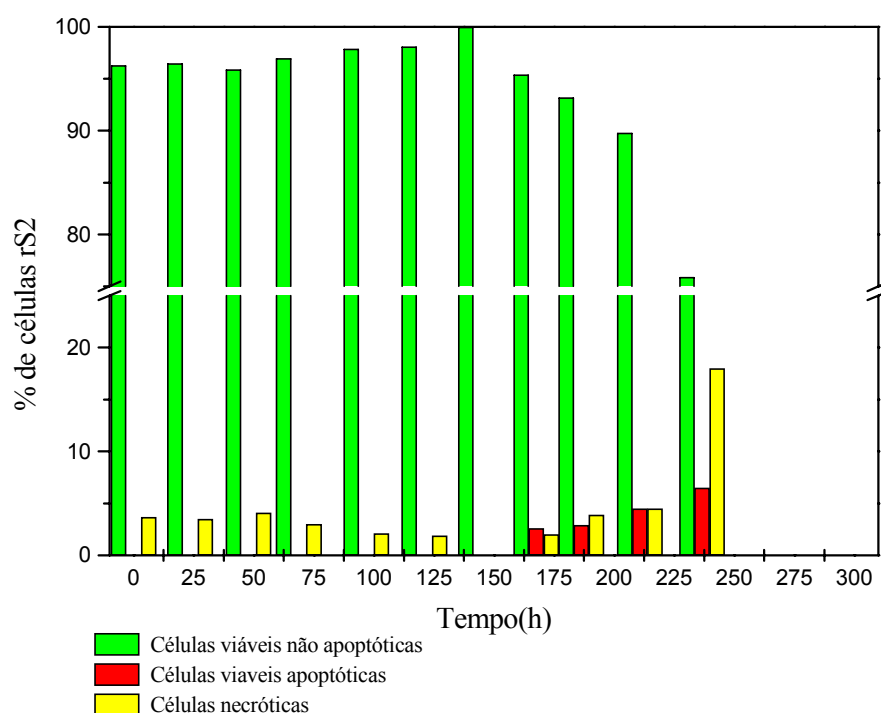


Figura 4.3. Evolução da viabilidade celular no experimento E2-rS2.

As características observadas nas células de inseto S2 e rS2 utilizando o método de fluorescência apresentaram-se semelhantes entre si e similares às observadas em trabalhos com as células de hibridoma e células de inseto da linhagem Sf-9 (MERCILLE *et al.*, 1994; MENESES-ACOSTA *et al.*, 2001). As células viáveis apresentaram coloração esverdeada devido à reação do corante de laranja de acridina com a cromatina (Figura 4.4 (a)). As células necróticas apresentaram a cromatina condensada com a coloração vermelha alaranjada devido à interação do brometo de etídio com a cromatina da célula (Figura 4.4 (b)).

Os núcleos apoptóticos das células S2 e rS2 apresentaram forma fragmentada e cor amarela (Figura 4.4 (1d, 2d, 3d)). Estas características morfológicas já foram observadas por COWGER *et al.* (1999) e MENESES-ACOSTA *et al.* (2001) nas células de inseto da linhagem Sf-9.

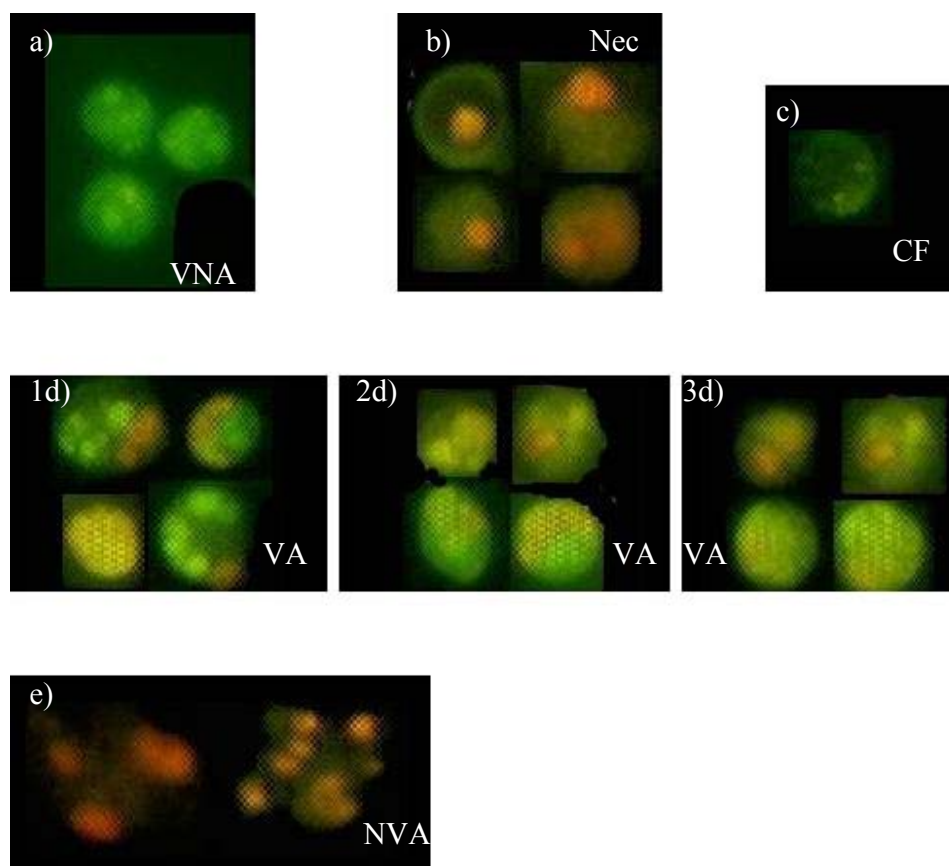


Figura 4.4. Identificação de várias populações de células em microscópio de fluorescência durante o cultivo de células S2 e rS2. a) Células viáveis não apoptóticas (VNA). b) Células necróticas (Nec). c) Células livres de cromatina (CF). d) Células viáveis apoptóticas (VA). e) Células não viáveis apoptóticas (NVA).

4.2. Consumo de nutrientes e viabilidade celular

Com intuito de analisar o consumo de nutrientes chave como aminoácidos e glicose no cultivo e comparar o metabolismo das células de inseto S2 e rS2, foram realizados os experimentos E3-S2, E4-rS2, E5-rS2 e E6-S2 em frasco Schott de 100 mL contendo um volume de trabalho de 20 mL de meio de cultura Sf-900 II a temperatura de 28° C e 100 rpm de rotação. A viabilidade celular em ambos os experimentos foi acompanhada pelo método de

exclusão de corante e de corante fluorescente. No entanto, devido ao baixo volume de trabalho (20 mL) optou-se em realizar nos experimentos E3-S2 e E4-rS2 análise dos consumos de aminoácidos e os experimentos E5-rS2 e E6-S2, análises dos consumos de glutamina e glicose, pois a soma dos volumes das amostras (950 μL) retiradas num único experimento para análises de aminoácidos, glicose e viabilidade celular, poderia interferir nas características do experimento durante os cultivos a ser realizados.

As curvas de crescimento e viabilidade celular dos experimentos E3-S2 e E4-rS2 estão apresentadas na Figuras 4.5 e as curvas da evolução da viabilidade estão na Figura 4.6 para o E3-S2 e na Figura 4.7 para o E4-rS2. Para ambos os experimentos observam-se o mesmo comportamento em relação à viabilidade celular, tal como descrito no item 4.1 (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3).

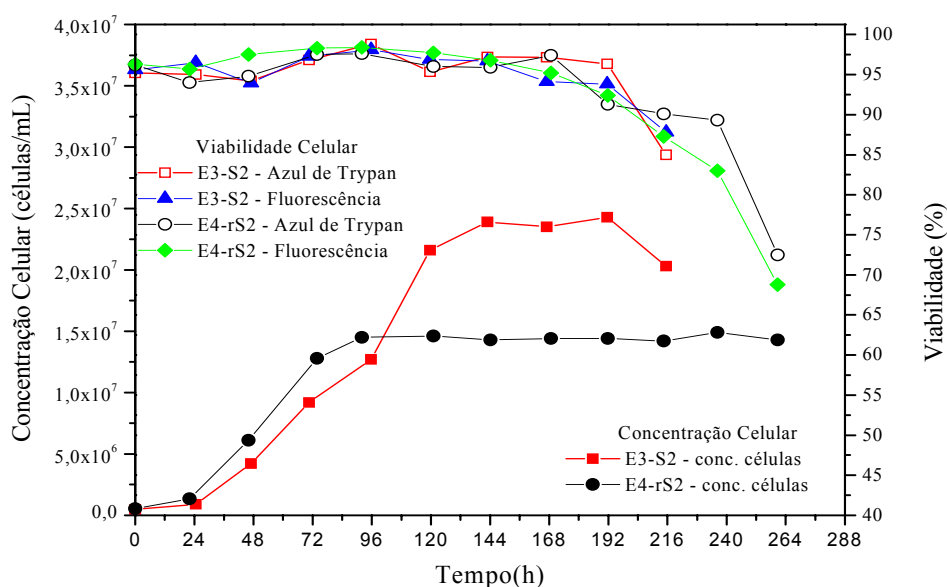


Figura 4.5. Resultados de crescimento celular no cultivo das células S2 e rS2 nos experimentos E3-S2 e E4-rS2.

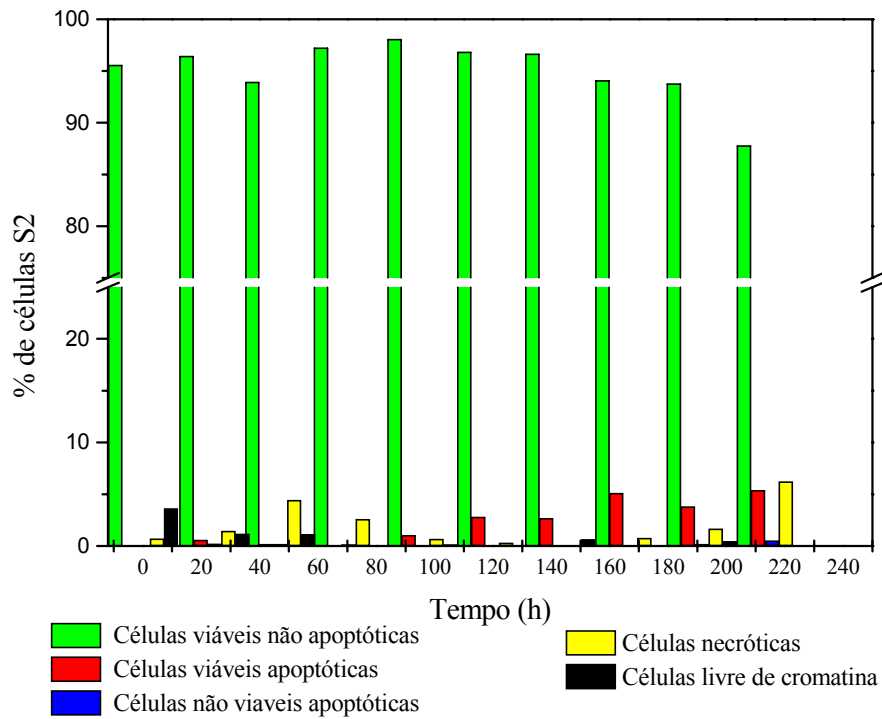


Figura 4.6. Evolução da viabilidade celular no experimento E3-S2 monitorada com o método da fluorescência.

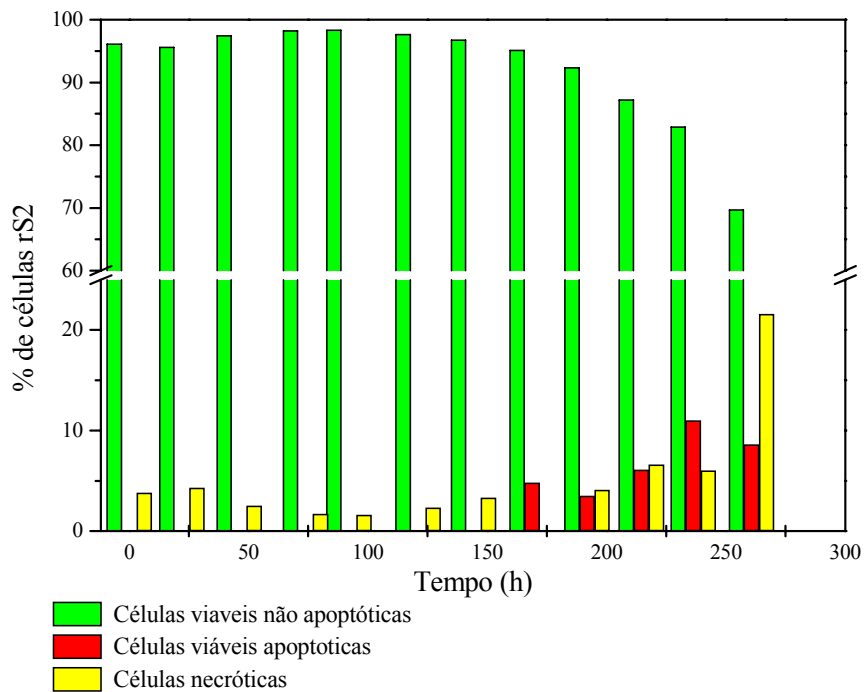


Figura 4.7. Evolução da viabilidade celular no experimento E4-rS2 monitorada com o método da fluorescência.

As Figuras 4.8 e 4.9 mostram os perfis de consumo e produção de aminoácidos em ambos os experimentos E3-S2 e E4-rS2. Os aminoácidos mais consumidos em ambas culturas foram cisteína, serina, prolina e histidina. No experimento E3-S2 (Figura 4.8), os aminoácidos serina, prolina e cisteína foram consumidos completamente, entretanto, apenas o aminoácido prolina teve consumo por completo pelas células rS2 no experimento E4-rS2 (Figura 4.9).

Analisando o perfil de aminoácidos em ambos os experimentos E3-S2 e E4-rS2 (Figuras 4.8 e 4.9) pode-se observar uma alta de produção de alanina. De acordo com BHATIA *et al.* (1997), a produção de alanina é alta em culturas de células de inseto que apresentam uma alta concentração inicial de glicose. Como neste trabalho os cultivos foram realizados com o meio Sf-900 II que possui uma alta concentração de glicose ($\cong 10$ g/L), a concentração de alanina alcançada com 168 h no experimento E3-S2 foi de 4,01 g/L e para o experimento E4-rS2 de 2,62 g/L.

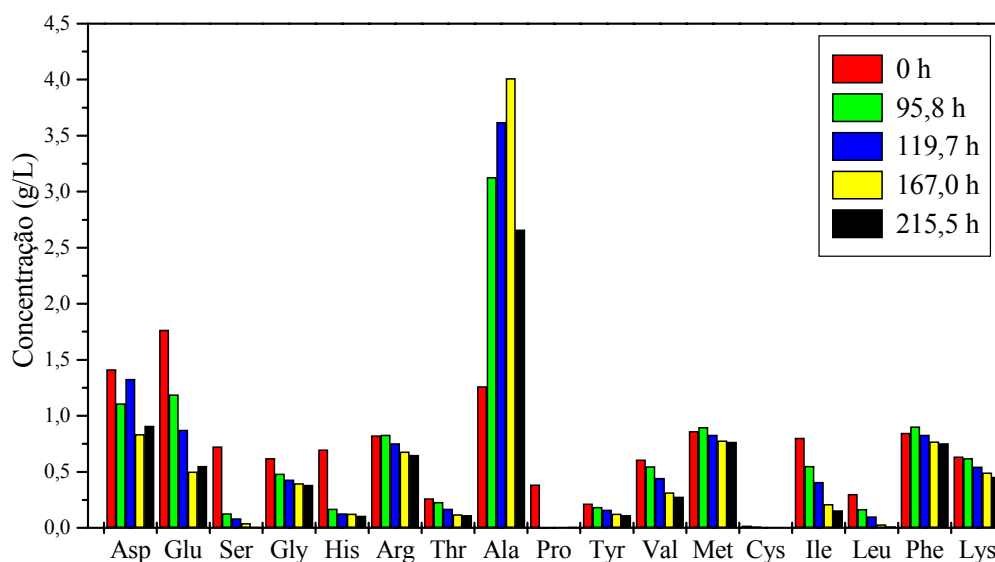


Figura 4.8. Consumo de aminoácidos no cultivo das células S2 no experimento E3-S2 em frasco Schott de 100 mL a 28°C e 100 rpm.

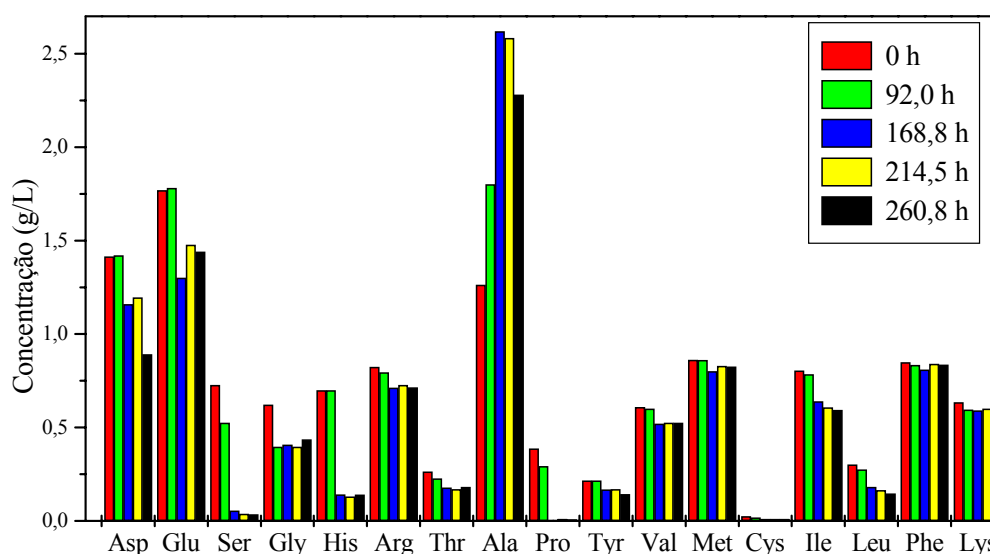


Figura 4.9. Consumo de aminoácidos no cultivo das células rS2 no experimento E4-rS2 em frasco Schott de 100 mL a 28°C e 100 rpm.

Por outro lado, observa-se o consumo alanina com 215,5 h e 260,8 h nos experimentos E3-S2 e E4-rS2, respectivamente. Tal observação pode indicar o consumo deste aminoácido como fonte de carbono na reposição de piruvato, intermediário da glicólise, o que também foi observado nos estudos de BÉDARD *et al.* (1993) e ARANTES (2004).

Na Figura 4.10 pode-se observar as diferenças nos metabolismos dos aminoácidos nas culturas das células S2 e rS2, considerando consumo de aminoácidos pelas células após 215,5 h de cultivo. Os aminoácidos que se apresentaram com maior diferença no consumo entre as células S2 e rS2 foram: glutamato 68,9% para as células S2 e 14,5% para as células rS2, valina 54,6% para as células S2 e 13,8% para as células rS2, isoleucina 80,4% para as células S2 e 24,5% para as células rS2. Estas diferenças de consumo de aminoácidos entre as células podem estar relacionadas a modificações genéticas, contudo, ainda não foi possível obter informações sobre as mudanças ocorridas na rota metabólica quando comparadas às células S2 e rS2.

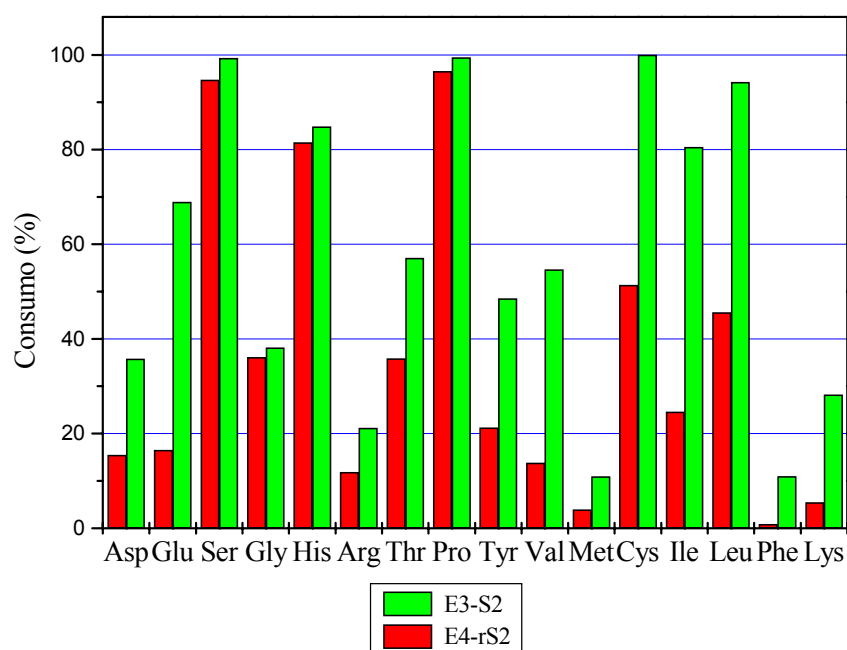


Figura 4.10. Porcentagem do consumo de aminoácido das células de inseto S2 e rS2 após 215,5 h de cultivo nos experimentos E3-S2 e E4-rS2.

Estudos indicam que a exaustão de aminoácidos é uma das causas do aparecimento das células apoptóticas no cultivo de células animais (SIMPSON *et al.*, 1996, SINGH *et al.*, 1996, MERCILLE *et al.*, 1994). Nas Figuras 4.11 e 4.12 estão relacionados os aminoácidos mais consumidos (consumo acima de 80%), para os experimentos E3-S2 e E4-rS2. No experimento E3-S2 as primeiras células apoptóticas apareceram com 96 h de cultivo, coincidindo com o esgotamento total de prolina no caldo de cultivo. A concentração de células apoptóticas alcançou o seu valor máximo de 5,4% com 215,5 horas, quando os aminoácidos serina e cisteína foram totalmente esgotados pelas células S2 (Figura 4.11). No experimento E4-rS2 as células apoptóticas apareceram após 120 horas de cultivo. A concentração de células apoptóticas atingiu seu máximo valor (11%) com 236 horas de cultivo, verificando-se um consumo próximo do total dos aminoácidos prolina e serina pelas células rS2 no E4-rS2 (Figura 4.12).

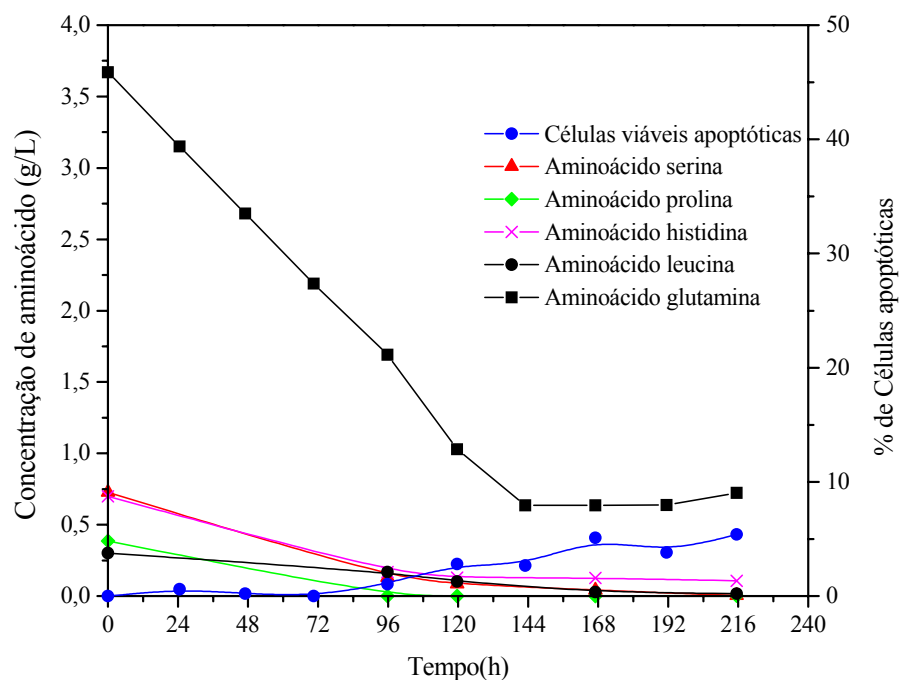


Figura 4.11. Consumo de aminoácidos correlacionado com a porcentagem de células S2 apoptóticas no experimento E3-S2.

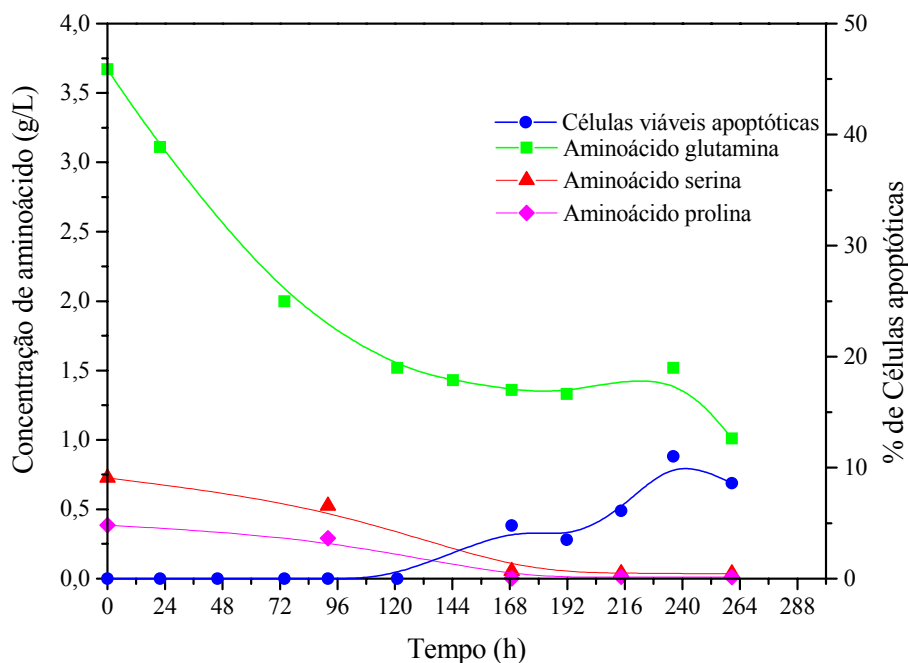


Figura 4.12. Consumo de aminoácidos correlacionado com a porcentagem de células rS2 apoptóticas no experimento E4-rS2.

O consumo de glutamina também foi analisado em ambos os experimentos E3-S2 e E4-rS2, uma vez que estudos realizados por MENESES-ACOSTA *et al.* (2001) com as células Sf-9 demonstram que o esgotamento da glutamina do caldo de cultivo está associado à apoptose. Entretanto, observa-se nas Figuras 4.11 e 4.12 que a glutamina não foi totalmente consumida nos experimentos E3-S2 e E4-rS2.

A Figura 4.13 apresenta os resultados obtidos nos experimentos E5-rS2 e E6-S2, de consumo de glicose em relação à viabilidade celular. Como pode se observar, a queda da viabilidade celular coincidiu com o esgotamento da glicose.

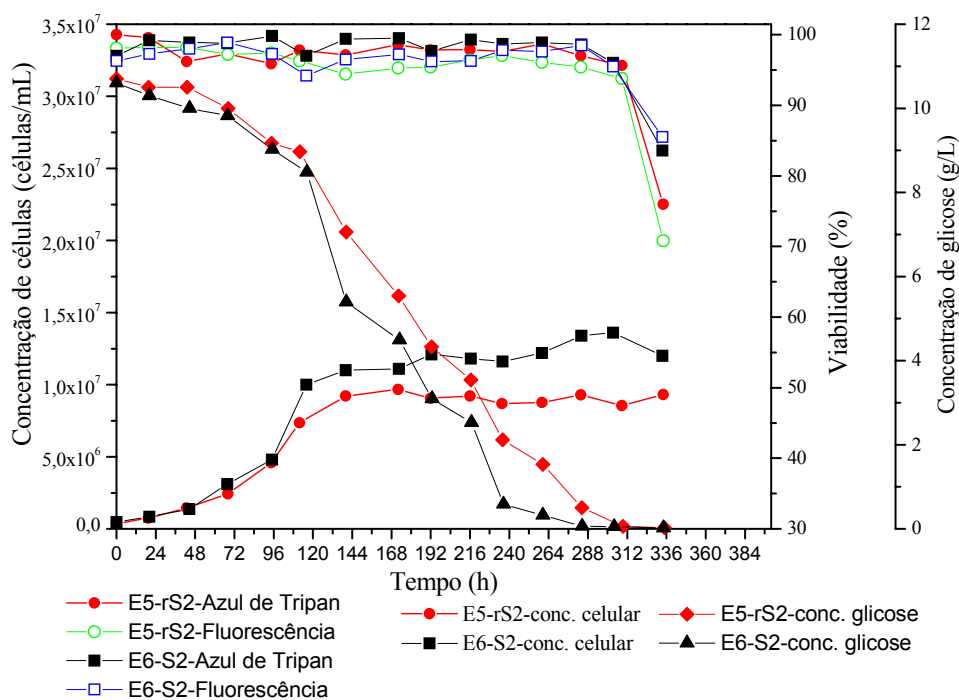


Figura 4.13. Consumo de glicose durante os experimentos E5-rS2 e E6-S2 com as células rS2 e S2, respectivamente, cultivadas em frasco Schott de 100 mL, com meio Sf-900 II em correlação com a viabilidade e a concentração celular.

O aparecimento de células apoptóticas para ambos os experimentos com 94 h de cultivo não está relacionado com os esgotamentos de glicose ou glutamina, uma vez que

ambos os nutrientes se encontram em alta concentração no experimento E5-rS2, 9,17 g/L e 1,82 g/L respectivamente, e no experimento E6-S2, 9,02 g/L e 1,74 g/L, respectivamente, como pode ser observado na Figura 4.14. O fato das células de *Drosophila melanogaster* apresentarem células apoptóticas com 94 horas de cultivo pode estar relacionado ao processo de morte natural das células, uma vez que a porcentagem de células apoptóticas não apresentou um índice muito alto durante os experimentos.

Na Figura 4.14 pode-se observar o aumento das células apoptóticas após o esgotamento da glicose. Tal constatação foi também observada nos estudos realizados por MENESES-ACOSTA et al. (2001) com a linhagem de células Sf-9 em meio TNM-FH suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, observando um aumento na porcentagem de células apoptóticas, quando há esgotamento da glicose do meio de cultura.

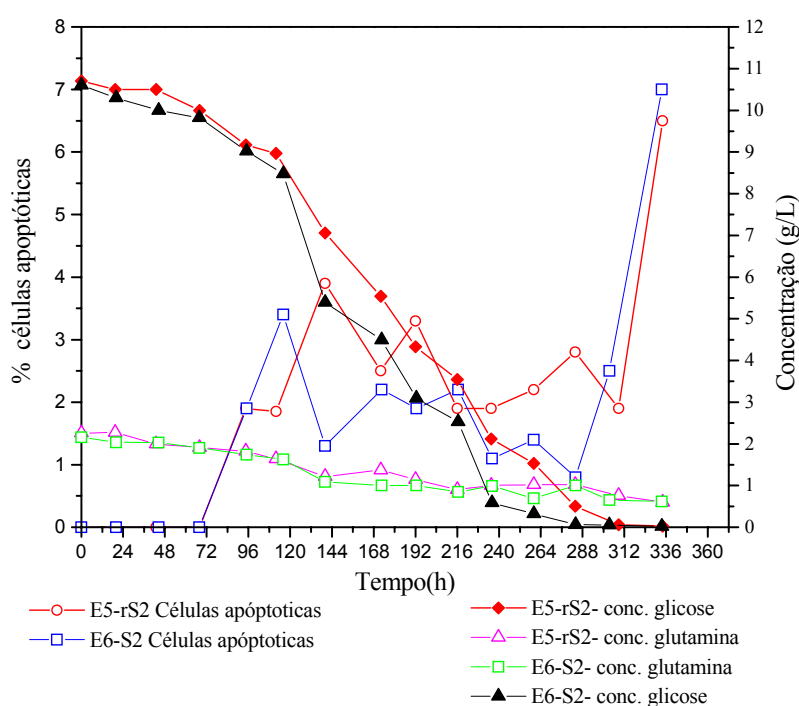


Figura 4.14. Consumo de glicose e glutamina durante os experimentos E5-rS2 e E6-S2 das células rS2 e S2, respectivamente, cultivadas em frasco Schott de 100 mL com meio Sf-900 II correlacionado com a porcentagem de células apoptóticas no cultivo das células rS2 e S2.

4.3. Análise da influência do inóculo no crescimento das células S2 e rS2

Os fatores principais que asseguram crescimento adequado em um determinado meio de cultura dependem do estado quantitativo e qualitativo do inóculo usado. Pode-se esperar que a fase de crescimento das células no inóculo, assim como a concentração celular possa influenciar significativamente o crescimento celular da nova cultura (KIOUKIA *et al.*, 1995). A exigência de uma concentração mínima de célula no inóculo pode ser explicada, por exemplo, pela existência de metabolitos que promovem o crescimento junto com o inóculo (TATICEK *et al.*, 2001).

Desta maneira foram realizados ensaios para verificar a influência da idade (I_{ino}) e concentração do inóculo (C_{ino}) no crescimento das células rS2. As curvas de crescimento obtidas para experimentos estão apresentadas na Figura 4.15. As viabilidades de todos os experimentos os ficaram entre 90 e 100%. Levando em conta a duração da fase lag, os experimentos 3 e 4 ($C_{ino} = 2,5 \times 10^5$ células/mL e $I_{ino} = 96$ h; $C_{ino} = 2,5 \times 10^5$ células/mL e $I_{ino} = 48$ h, respectivamente) ambos com $2,5 \times 10^5$ células/mL no inóculo apresentaram uma tendência em apresentar uma fase lag maior. A idade do inóculo parece não ter nenhum efeito na duração de fase lag. Esta tendência da fase lag mais prolongada para o inóculo de $2,5 \times 10^5$ células/mL está de acordo com outros estudos da literatura que recomendam inocular células de inseto em densidades de pelo menos $5,0 \times 10^5$ células/mL para evitar atrasos significativos no crescimento (CLEM, 1992; MILLER *et al.*, 1986; SUMMERS & SMITH, 1987). TATICEK *et al.* (2001) cultivando células de Sf-21 em meio Ex-CELL 400-SFM em frasco spinner mostraram que uma concentração de inóculo abaixo de $3,0 \times 10^5$ células/mL resultou em uma fase lag prolongada.

As culturas que alcançaram maiores concentrações de células e produtividade foram às iniciadas com uma concentração de inóculo de $7,5 \times 10^5$ células/mL e idade 48 horas. Na

Figura 4.15 e Tabela 4.1 pode ser visto que para inóculo de baixa idade, a cultura teve características de crescimento semelhantes, não sendo este influenciado pela concentração de inóculo. Por outro lado, aumentando da idade do inóculo, as células estavam limitadas pela alta concentração inicial de células. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que em inóculo novo (48 horas), as células estavam possivelmente na fase inicial ou média de crescimento exponencial. Com uma idade de inóculo de 96 horas, as células estavam perto do fim da fase exponencial, sendo mais sensível a altas concentrações de células.

TATICEK *et al.* (2001) estudando a cultura de células Sf-21 em meio Ex-CELL 400 SFM em frascos spinner a 150 rpm, observaram que a concentração de inóculo de $5,0 \times 10^5$ células/mL foi a que rendeu valores maiores na velocidade específica de crescimento, concentração de célula máxima e produtividade de célula. No mesmo estudo, utilizando células Tn 5B-1-4, a maior velocidade específica máxima de crescimento foi obtida com um inóculo de cerca de $2,4 \times 10^5$ células/mL, enquanto a produtividade máxima em célula ocorreu com aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/mL. KIOUKIA *et al.* (1995) trabalhando com a linhagem de inseto Sf-9 demonstram que para o inóculo proveniente da fase estacionária, a velocidade específica de crescimento foi insatisfatória em relação ao inóculo derivado da fase inicial e final da exponencial. Quando o efeito da concentração do inóculo foi examinado, os resultados obtidos mostraram que, baixas concentrações de inóculo, resultaram em períodos maiores da fase lag em relação ao inóculo com alta concentração de células.

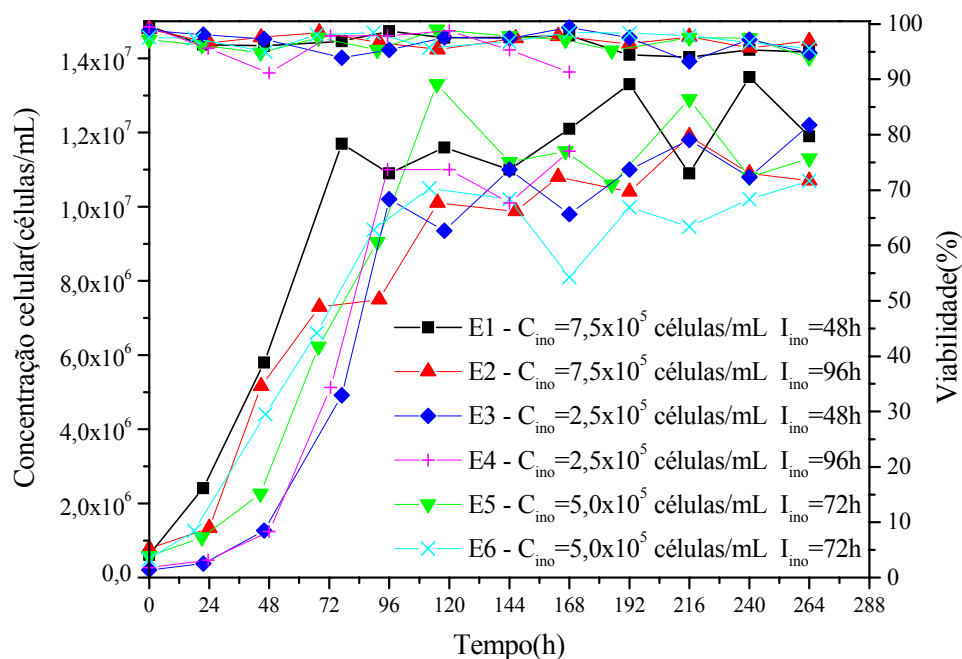


Figura 4.15. Resultados do crescimento das células rS2 em experimentos realizados com diferentes concentrações de inóculo (C_{ino}) e idades inóculo (I_{ino}) em frasco Schott de 100 mL, agitação 100 rpm e meio Sf-900 II.

Tabela 4.1. Resultados dos experimentos de cultivo com as células rS2 em meio de cultivo Sf-900 II variando a concentração e idade do inóculo.

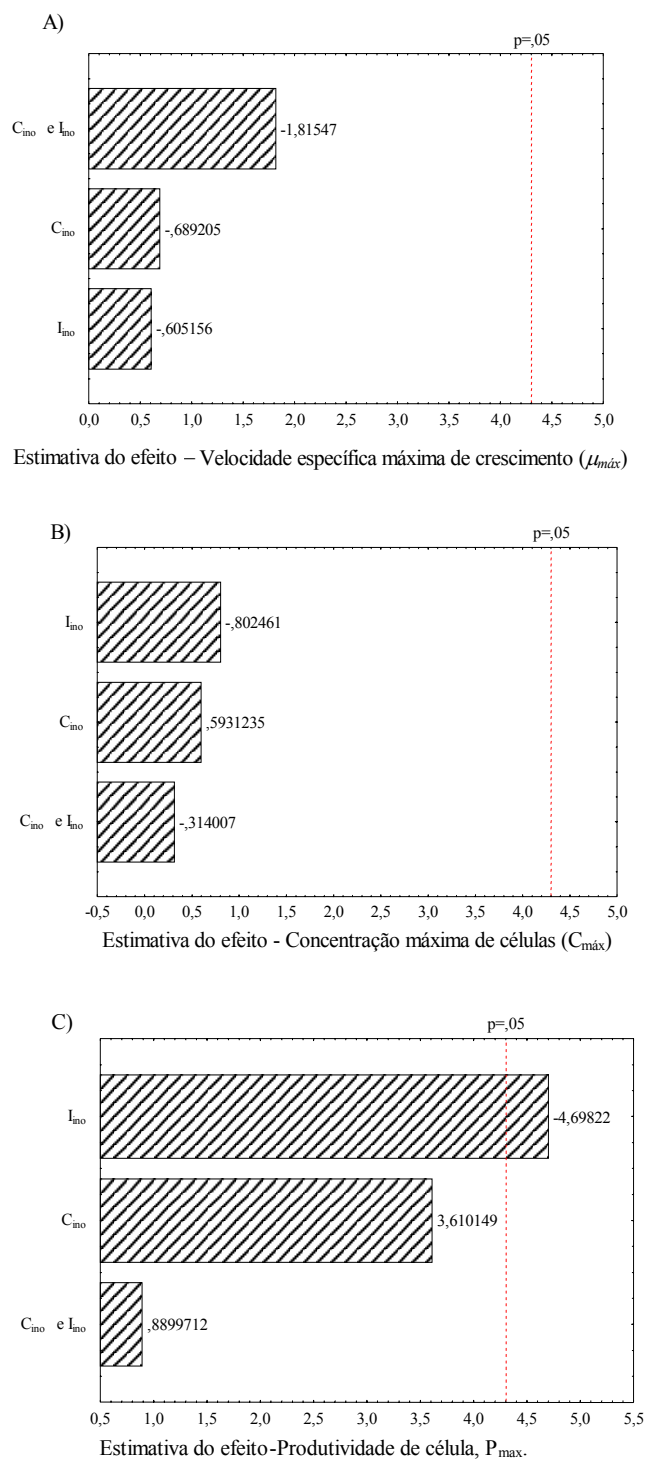
Experimento	Descrição	μ_{max} (h^{-1})	C_{max} (células/mL)	Produtividade máxima em células, P_{max} (células/mL.h)
E1	$C_{ino} = 7,5 \times 10^5$, $I_{ino} = 48$	0,0485	$1,35 \times 10^7$	$1,44 \times 10^5$
E2	$C_{ino} = 7,5 \times 10^5$, $I_{ino} = 96$	0,0341	$1,19 \times 10^7$	$1,03 \times 10^5$
E3	$C_{ino} = 2,5 \times 10^5$, $I_{ino} = 48$	0,0418	$1,22 \times 10^7$	$1,02 \times 10^5$
E4	$C_{ino} = 2,5 \times 10^5$, $I_{ino} = 96$	0,0490	$1,15 \times 10^7$	$1,13 \times 10^5$
E5	$C_{ino} = 5,0 \times 10^5$, $I_{ino} = 72$	0,0347	$1,33 \times 10^7$	$1,16 \times 10^5$
E6	$C_{ino} = 5,0 \times 10^5$, $I_{ino} = 72$	0,0380	$1,05 \times 10^7$	$9,91 \times 10^4$

4.4. Análise do planejamento fatorial

A influência da concentração do inóculo e idade do inóculo como variáveis independentes foi analisada com relação à velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), concentração máxima de células (C_{max}) e máxima produtividade em células (P_{max}) estabelecendo um planejamento fatorial 2^2 com dois pontos centrais.

Fazendo uma análise estatística dos valores obtidos para μ_{max} e C_{max} utilizando o Software Stastic 5.0, como pode ser visto nas Figuras 4.16 A e B, o efeito do inóculo segundo a classificação das variáveis concentração e idade do inóculo, a interação destas duas variáveis não teve resultado expressivo em μ_{max} e em C_{max} . Na Figura 4.16 C, pode ser visto que a variável idade do inóculo teve um efeito significativo na produtividade máxima em células.

A variável idade do inóculo (I_{ino}) não tem nenhum efeito significativo na velocidade específica máxima de crescimento e na concentração máxima de células. DOVERSKOG *et al.* (2000) mostraram que a variação da concentração do inóculo de 3,0 a 10,0 x 10⁵ células/mL na cultura das células Sf-9 em meio Sf-900 II não teve nenhum efeito na avaliação do μ_{max}



Figuras 4.16. Efeitos padronizados dos experimentos do planejamento fatorial de 2^2 considerando a resposta das variáveis: (A) Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}); B) Concentração máxima de células (C_{max}) e C) Produtividade de célula (P_{max}).

4.5. Análise da oxigenação do meio no crescimento celular

Os resultados dos experimentos realizados para avaliar o consumo de nutrientes (aminoácidos e glicose) demonstraram que as curvas de crescimento das células S2 e rS2 entram na fase de desaceleração de crescimento com altos níveis de nutrientes solúveis no meio de cultivo Sf-900 II. O fato de o crescimento celular desacelerar pode estar relacionado à escassez de oxigênio no meio de cultivo celular, pois uma concentração de oxigênio dissolvido não limitante pode ser decisiva para um ótimo crescimento e produção da proteína.

4.5.1. Transferência de oxigênio no frasco Schott

Esse ensaio teve como objetivo determinar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) no frasco Schott de 250 mL com volume de trabalho de 50 mL de líquido (água e o meio Sf-900 II), em condições de cultivo 100 rpm e temperatura de 28°C.

Para determinação do k_{La} foi utilizado o frasco Schott com a tampa modificada como descrito no item 3.1.5.4 (Figura 3.1) e o método dinâmico (item 3.6.2). A alimentação de ar no espaço gasoso do frasco Schott foi realizada através de bomba peristáltica (Ismatec, modelo BVP) possibilitando trabalhar com várias vazões de ar. A Figura 4.17 mostra a variação do oxigênio dissolvido com diversas vazões de ar.

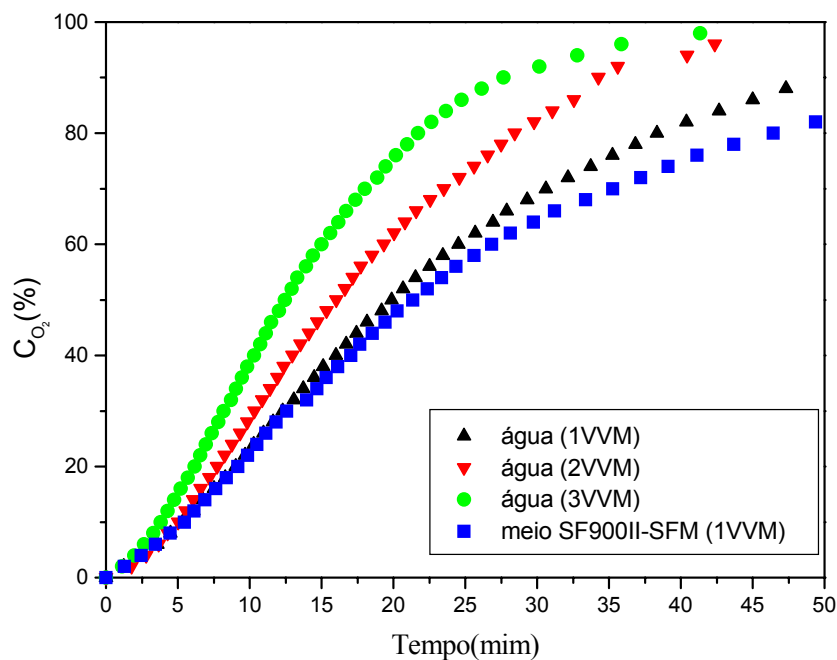


Figura 4.17. Variação da concentração do oxigênio dissolvido em frasco Schott de 250 mL com volume de trabalho de 50 mL, durante a utilização do método dinâmico oxigenando água a: a) 1 vvm, b) 2 vvm, c) 3 vvm e o meio Sf-900 II a: 1 vvm.

Na Tabela 4.2 estão apresentados os valores obtidos de k_La para o sistema composto por água e para o composto por meio Sf-900 II. Podemos verificar que as diferenças entre os valores de k_La não se apresentaram muito significativas, mesmo sabendo que no meio de cultivo estão incorporados nutrientes que poderiam dificultar a transferência de oxigênio.

Tabela 4.2. Valores de k_La , para diversas vazões de ar no espaço gasoso de um frasco Schott de 250 mL.

Líquido	Vazão de ar (vvm)	k_La (s^{-1})
Água	3	$1,72 \times 10^{-3}$
Água	2	$1,08 \times 10^{-3}$
Água	1	$7,73 \times 10^{-4}$
Meio Sf-900 II	1	$7,38 \times 10^{-4}$

4.5.2. Características de respiração das células S2 e rS2

Para os estudos das características da respiração das células S2 e rS2 foram realizados experimentos cujas características estão apresentadas na Tabela 4.3.

Todos os experimentos foram realizados em frasco Schott de 250 mL com volume de trabalho de 50 mL de meio Sf-900 II com uma agitação de 100 rpm a temperatura de 28°C.

Tabela 4.3. Características dos experimentos realizados para monitoramento da concentração do oxigênio dissolvido no meio de cultivo em frasco Schott de 250mL.

Ensaio	Células	Características
E7	rS2	Meio inicialmente com 100% de oxigênio dissolvido, com vazão de ar 1vvm para oxigenação superficial.
E8	S2	Meio inicialmente com 100% de oxigênio dissolvido, com vazão de ar 1vvm para oxigenação superficial.
E9	S2	Meio inicialmente com 100% de oxigênio dissolvido, após a inoculação foi bombeada em conjunto uma vazão de ar de 0,95 vvm e 0,05 vvm de oxigênio puro. Etapas realizadas durante o experimento: A) diminuição na vazão de oxigênio puro na entrada de 0,05 para 0,04 vvm B) fechamento da entrada do oxigênio puro e diminuição na vazão de ar para 0,5 vvm C) diminuição na vazão de ar para 0,25 vvm D) fechamento da alimentação de ar pela bomba.
E10	rS2	Sem oxigenação superficial

Na Figura 4.18 pode se observar às curvas de crescimento e viabilidade celulares dos ensaios E7-rS2, E8-S2, E9-S2 e E10-rS2. A viabilidade celular nos experimentos manteve-se entre 99 e 97% durante 187 horas de cultivo, independentemente das características dos experimentos como definidas na Tabela 4.3. Como se pode ser observar na Figura 4.18, a queda da viabilidade celular ocorre após 187 horas de cultivo no ensaio E7-S2. Este fato está relacionado ao esgotamento da glicose do caldo de cultivo como se observa na Figura 4.19.

Para os experimentos E8-S2 e E9-rS2 observa-se o mesmo comportamento em relação à queda da viabilidade celular ocorrendo após o esgotamento total da glicose (Figura 4.18 e Figura 4.19).

Os consumos de glicose e glutamina para ambos os experimentos E7-rS2, E8-S2 e E9-S2 tiveram os mesmos comportamentos já observados nos experimentos E5-rS2 e E6-S2 no item 4.2 (Figura 4.19 e 4.20).

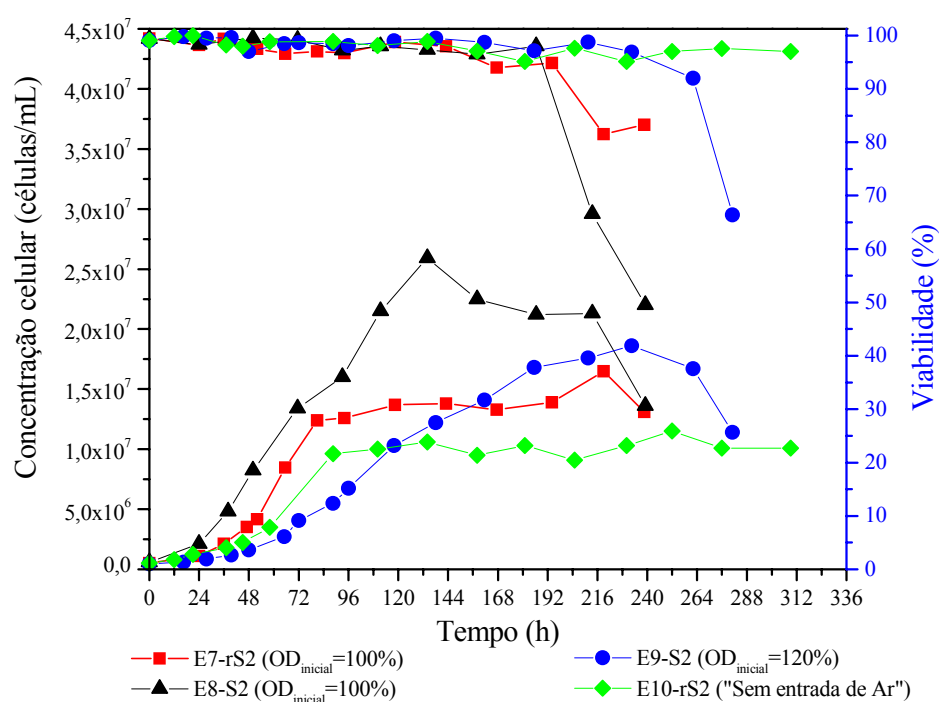


Figura 4.18. Resultados do crescimento e das viabilidades celular das células S2 e rS2 nos experimentos realizados com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C.

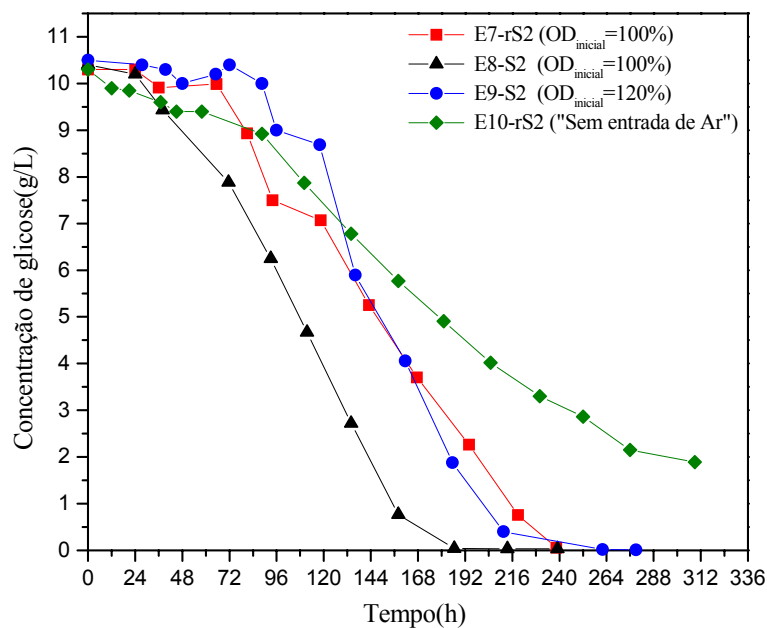


Figura 4.19. Consumo de glicose nos cultivos das células S2 e rS2, com vazão de ar de 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C.

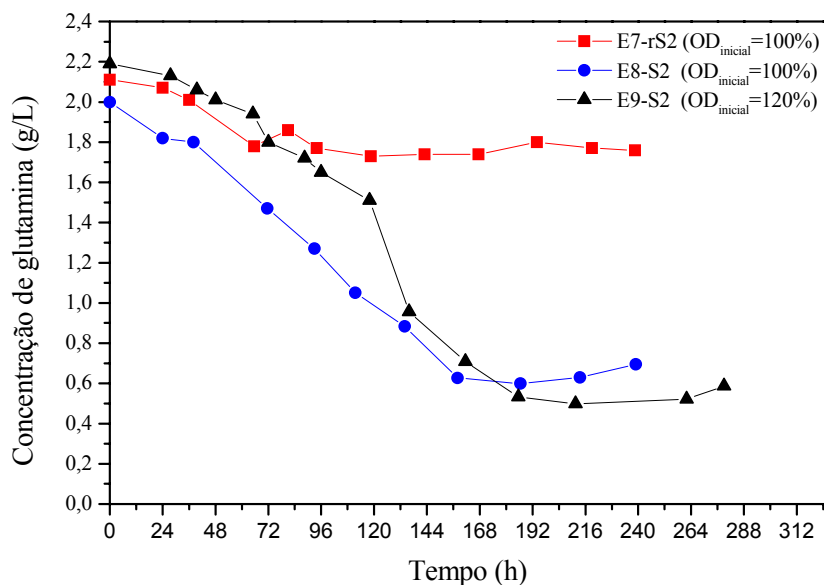


Figura 4.20. Consumo de glutamina nos cultivos das células S2 e rS2 com vazão de ar de 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C.

Nos experimentos E7-rS2 e E8-S2, os inícios das desacelerações dos crescimentos coincidem com o nível muito baixo de oxigênio no caldo de cultivo. No experimento E7-rS2 a concentração de oxigênio dissolvido atinge 6% da saturação (0,013 mmol/L), enquanto que no experimento E8-S2 atinge 2% da saturação (0,004 mmol/L) (Figura 4.21). Estudos de GOTOH *et al.* (2004) realizados com linhagem de células Sf-9 demonstram que a concentração crítica de oxigênio dissolvido está em torno de 2,5% no meio de cultivo. Entretanto os experimentos E7-rS2 e E8-S2 onde o oxigênio aparentemente foi o fator limitante para crescimento celular, a viabilidade manteve-se alta, entre 99 e 95%, somente ocorrendo queda da viabilidade após 194 horas para o experimento E7-rS2 e 186,5 horas para o experimento E8-S2 devido ao esgotamento da glicose no meio de cultivo (Figura 4.21, 4.18 e 4.19). Esta alta tolerância à falta de oxigênio nas células S2 e rS2 pode estar relacionada com a resistência da *Drosophila melanogaster* a anoxia. Os mecanismos de tolerância desse inseto à escassez de oxigênio ainda não estão bem definidos. Estudo recente tem demonstrado que na fase embrionária, a *Drosophila melanogaster* tem um mecanismo natural de proteção das células diante do estresse causado por anoxia (CHEN *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003).

Entretanto, RHEIL & MURHAMMER (1995) demonstraram que anoxia (falta de oxigênio) em qualquer momento do cultivo das células Sf-9 influencia o crescimento celular. Este fato causa a desaceleração do crescimento e a diferenças no μ_{max} e na concentração máxima de células como demonstrado na Tabela 4.4 e Figura 4.21.

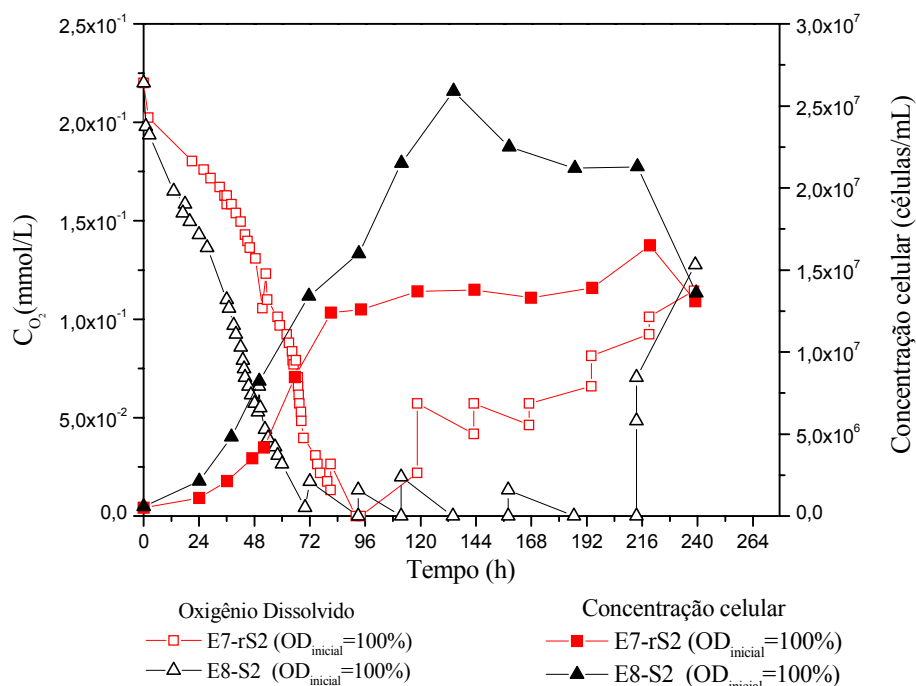


Figura 4.21. Curvas de crescimento celular e variação de oxigênio dissolvido nos experimentos E7-rS2 e E8-S2 com as células rS2 e S2, com vazão de ar de 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C.

No entanto o excesso de oxigênio dissolvido (hiperoxia) no início do experimento E9-S2 também afetou o crescimento celular como pode ser observado na Figura 4.22. Devido ao efeito negativo da alta concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo na célula S2 como pode se observar na Figura 4.23.(A), optou-se em fazer a oxigenação superficial em etapas como descrito na Tabela 4.3. O fato de diminuir o fornecimento de ar enriquecido de oxigênio fez com que as células crescessem até 232 horas atingindo uma concentração de $1,86 \times 10^7$ células/mL. Na observação no microscópio com o método de fluorescência foi verificado que as características externas das células foram afetadas no início do experimento quando o meio estava com uma concentração de oxigênio dissolvido de 120% ao ser comparado com experimento em que o meio não foi oxigenado (E10-rS2, Figura 4.23.(B)). A recuperação das

células ocorreu somente após 70 horas, depois da interrupção da entrada de ar enriquecido com oxigênio (Figura 4.23.(C)).

A exposição à hiperoxia causou um efeito negativo muito forte no crescimento celular como está demonstrado na Tabela 4.4. Estudos recentes realizados por HETZ & BRADLEY (2005) demonstram a existência de mecanismos que regulam a concentração de oxigênio no tecido da mosca *Drosophila melanogaster*, pois a concentração de oxigênio em condições atmosféricas normais tem efeito tóxico para este inseto, este fato pode estar relacionado com o decréscimo acentuado da velocidade específica de respiração celular no início dos experimentos onde há uma concentração de oxigênio acima de 60% de oxigênio dissolvido.

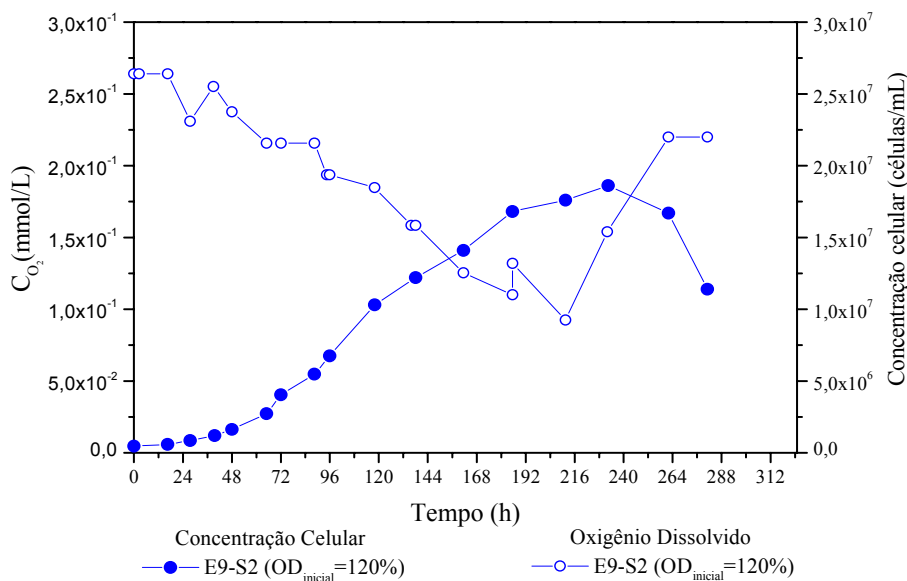


Figura 4.22. Curva de crescimento celular e variação de oxigênio dissolvido no experimento E9-S2 com as células S2 no frasco Schott de 250 mL, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C.

Tabela 4.4. Resultados obtidos nos experimentos utilizando as células S2 e rS2 realizados com vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, em relação à μ_{max} e concentração máxima de células.

Ensaio	Células	μ_{max} (h^{-1})	Concentração máxima de células (células/mL)
E7	rS2	0,0534	$1,65 \times 10^7$
E8	S2	0,0431	$2,59 \times 10^7$
E9	S2	0,0337	$1,86 \times 10^7$
E10	rS2	0,0323	$1,06 \times 10^7$

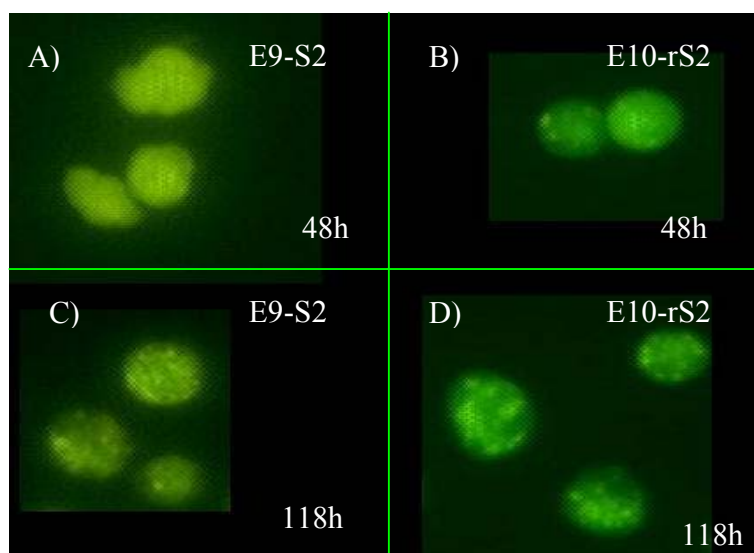


Figura 4.23. Estado morfológico das células S2 no E9-S2 em cultivo com excesso de oxigênio (120%) inicial: A) 48 h e C) 118 h e cultivo sem oxigenação no E4-rS2: B) 48 h e D) 118 h de cultivo.

Na Figura 4.24 observa-se o decréscimo da velocidade específica de respiração celular (Q_{o_2}) das células S2 e rS2 durante a fase de crescimento exponencial. No experimento E7-rS2 o decréscimo da velocidade específica de respiração celular (Q_{o_2}) das células rS2 foi de $6,08 \times 10^{-9}$ para $1,22 \times 10^{-10}$ mmol/célula.h. O decréscimo da velocidade específica da respiração celular (Q_{o_2}) das células S2 no experimento E8-S2 foi de $4,82 \times 10^{-9}$ para $1,17 \times 10^{-10}$ mmol/célula.h e para o experimento E9-S2 foi de $7,69 \times 10^{-9}$ para $1,22 \times 10^{-10}$

mmol/célula.h. Estudos realizados por RHIEL *et al.* (1997) com as células High FiveTM (Tn-5) e Sf-9 ambas cultivadas em meio Sf-900 II com o oxigênio dissolvido controlado a 50% da saturação do ar, identificaram aproximadamente o mesmo formato no perfil da velocidade específica de respiração celular na fase de crescimento exponencial. Os pesquisadores verificaram um decréscimo da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) na fase de crescimento exponencial para as células High FiveTM (Tn-5) de aproximadamente $5,40 \times 10^{-9}$ para $2,88 \times 10^{-9}$ mmol/célula.h (Figura 4.25). Para as células Sf-9 o decréscimo da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) na fase de crescimento exponencial foi aproximadamente de $1,8 \times 10^{-9}$ para $0,72 \times 10^{-9}$ mmol/célula.h (Figura 4.25).

Entretanto, podemos notar que este decréscimo da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) na fase de crescimento exponencial foi mais acentuado para as células S2 e rS2 em relação às células High FiveTM (Tn-5) e Sf-9.

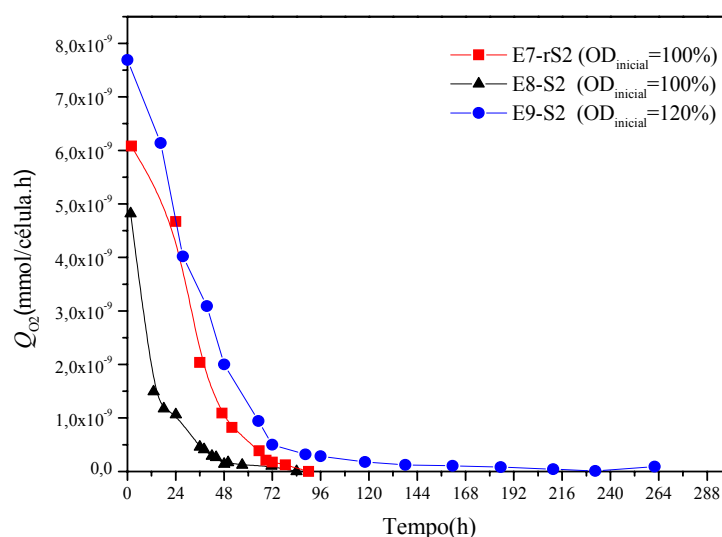


Figura 4.24. Variação de Q_{O_2} nos experimentos E7-rS2, E8-S2 e E9-S2 com as células S2 e rS2 utilizando vazão de ar de 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 250 mL, agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28° C.

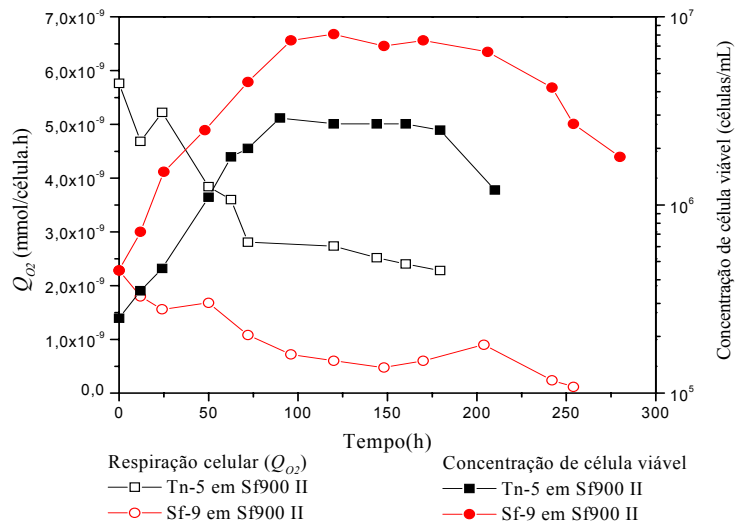


Figura 4.25. Variação de Q_{O_2} e crescimento celular das células High FiveTM (Tn-5) e Sf-9, ambas as células cultivadas em meio Sf-900 II, biorreator Applikon, com volume de trabalho de 1,4 L em função do tempo de cultivo celular. Gráfico adaptado dos estudos realizados por RHIEL *et al.* (1997).

Geralmente o oxigênio dissolvido no meio de cultivo é dependente da velocidade específica de consumo de oxigênio. Esta é descrita em estudos realizados com as células Sf-9 como sendo do tipo Monod (Equação 4.1) (GOTOH *et al.*, 2002; GOTOH *et al.*, 2004), mostrada a seguir:

$$Q_{O_2} = \frac{Q_{O_2 \max} \times C_{O_2}}{K_S + C_{O_2}} \quad (4.1)$$

onde, $Q_{O_2 \max}$ é velocidade específica máxima de consumo de oxigênio e K_S é a constante de saturação.

Contudo, pode-se observar na Figura 4.26 que experimento E7-rS2 e E8-S2 não apresentam o perfil descrito pelo modelo do tipo Monod em relação à velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}). O ensaio E9-S2 mesmo sendo mais oxigenado não apresentou um perfil do tipo Monod.

Nos experimentos E7-rS2 e E8-S2 os perfis da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) apresentaram uma queda acentuada até próximo de 60% (0,132 mmol/L) de oxigênio dissolvido e uma faixa aproximadamente constante, 60% (0,132 mmol/L) e 20% (0,044 mmol/L) de oxigênio dissolvido isto pode ser observado na Figura 4.26. O resultado do experimento E9-S2 demonstra que o perfil da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) é aproximadamente constante após o crescimento exponencial celular, independente da faixa de oxigênio dissolvido registrada no caldo do cultivo neste experimento (E9-S2).

Os resultados obtidos nos experimentos E7-rS2, E8-S2 e E9-S2 demonstram que um estudo mais minucioso da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) deve ser realizado em um sistema onde se permita um controle mais rigoroso do oxigênio dissolvido no caldo de cultivo para podermos obter um modelo da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) em função da concentração de oxigênio dissolvido.

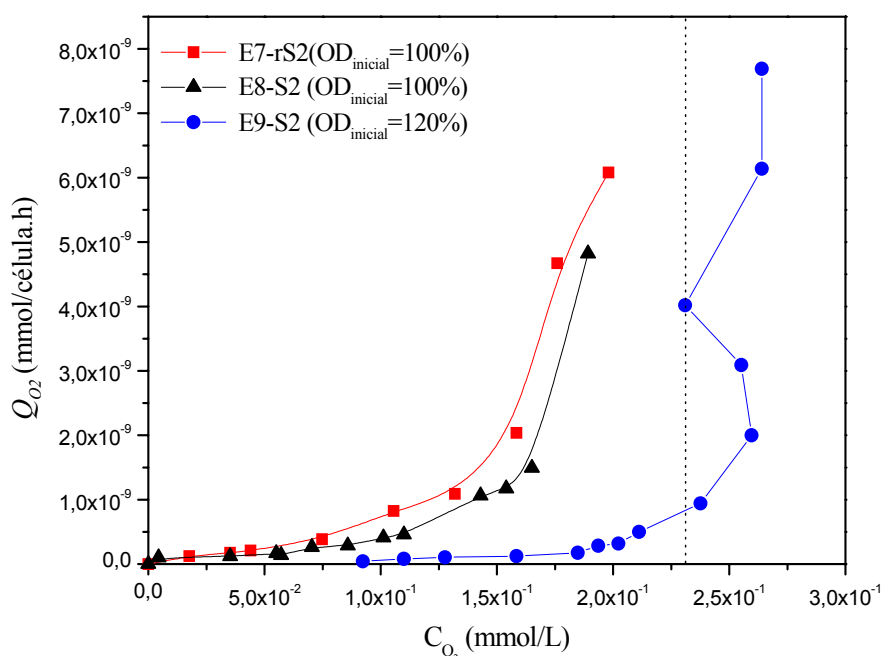


Figura 4.26. Variação de Q_{O_2} com a concentração de oxigênio dissolvido (C_{O_2}) das células S2 e rS2 nos experimentos E7-rS2, E8-S2 e E9-S2 com vazão de ar de 1 vvm para oxigenação superficial no frasco Schott de 250 mL, meio Sf-900 II, com agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 28°C.

4.5.3. Estudo da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) das células rS2 em Schott de 100 mL

Com intuito de estudar mais a fundo as características de respiração da célula rS2 foram realizados experimentos adicionais em frasco Schott com oxigenação superficial. No entanto, não foi mais possível à utilização do eletrodo galvânico para as medidas do oxigênio dissolvido, devido à quebra do mesmo. Então se optou por um eletrodo polarográfico, contudo, não foi possível realizar os experimentos no frasco Schott de 250 mL em razão do comprimento do eletrodo polarográfico ser menor que do eletrodo galvânico. Como as tampas dos frascos Schott são padronizadas independente do volume (100 mL, 250 mL, 500 mL e 1000 mL), fez-se uso nos novos experimentos do frasco Schott de 100 mL com volume de trabalho 20 mL de meio Sf-900 II, a temperatura de 28°C no cultivo de células rS2. As principais características dos experimentos realizados estão apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Características dos experimentos adicionais com a célula rS2 utilizando frasco Schott de 100 mL, com volume de trabalho de 20 mL, meio Sf-900 II, temperatura de 28°C e oxigenação superficial.

Experimentos	Características	Objetivos
E11-rS2	Vazão de ar 1 vvm, agitação orbital de 100rpm, com eletrodo.	Monitorar oxigênio dissolvido, velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) e influência do eletrodo no cultivo.
E12-rS2	Sem eletrodo, agitação orbital de 100 rpm e sem oxigenação superficial.	Avaliar a influência da agitação no crescimento celular.
E13-rS2	Sem eletrodo, agitação orbital de 90 rpm e sem oxigenação superficial.	Avaliar a influência da agitação no Q_{O_2} e no crescimento celular.
E14-rS2	Sem eletrodo, agitação orbital de 120 rpm e sem oxigenação superficial.	Avaliar a influência da agitação no Q_{O_2} e no crescimento celular.

Inicialmente foram realizados experimentos com o intuito de analisar a velocidade específica de respiração celular das células rS2 cultivadas no frasco Schott de 100 mL. No entanto, os experimentos apresentaram um baixo crescimento celular no início, então se optou por interromper os cultivos. A primeira hipótese era que o inóculo provinha de um frasco Schott em estoque com 18 passagens, com isso às células estariam perdendo a sua capacidade de crescimento. A segunda hipótese foi que a presença do eletrodo estaria influenciando o crescimento celular, pois houve uma diminuição no volume de trabalho de 50 mL para 20 mL e no diâmetro interno do frasco Schott, aproximadamente passou de 5,9 para 4,5 cm, no entanto, se manteve o diâmetro do eletrodo, isto poderia estar causando cisalhamento em níveis prejudiciais as células.

Diante destas hipóteses optou-se em descongelar um novo criotubo de células rS2, para que não houvesse problema com o número de passagens e realizar experimentos com o objetivo de avaliar a influência do eletrodo e da agitação no crescimento celular.

Pode se notar na Figura 4.27 os resultados obtidos no experimento E11-rS2, cujo inóculo foi realizado com células provindas de um frasco Schott estoque de uma passagem. A Figura 4.27 demonstra que a concentração de oxigênio dissolvido para os experimentos E11-rS2 manteve se em níveis altos, entre 0,18 mmol/L (82%) a 0,04 mmol/L (20%) durante a fase de crescimento exponencial. Assim sendo, a concentração de oxigênio dissolvido não foi um fator que poderia estar limitando o crescimento das células.

A curva da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) em relação ao tempo de cultivo (Figura 4.27) e em relação à concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (Figura 4.28) apresentaram formatos semelhantes à queda do experimento anterior realizado no frasco Schott de 250 mL com eletrodo galvânico (Figura 4.24 e 4.26). Entretanto, a ordem de grandeza da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) foi 15 vezes menor em

relação ao experimento (E7-rS2) realizado no frasco Schott de 250 mL. Comparando o experimento E11-rS2 com o experimento E7-rS2 do item anterior (Figura 4.24), percebe-se que após 2 horas do início do cultivo o experimento E11-rS2 apresentou uma velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) aproximadamente igual a $3,85 \times 10^{-10}$ mmol/célula.h e o experimento E7-rS2 realizado no frasco Schott de 250 mL apresentou uma velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) aproximadamente igual a $6,08 \times 10^{-9}$ mmol/célula.h.

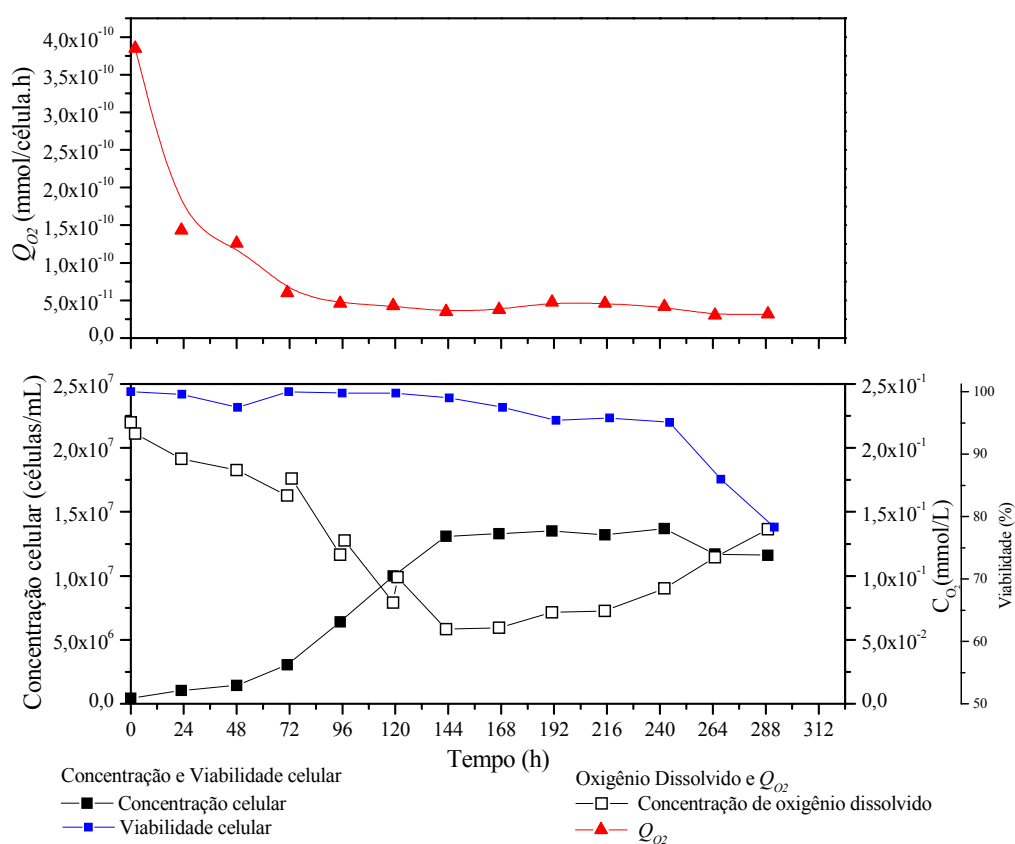


Figura 4.27. Resultados do experimento E11-rS2, com vazão de ar de 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 100 mL, com volume de trabalho de 20 mL, meio Sf-900 II, temperatura de 28°C e agitação orbital de 100 rpm.

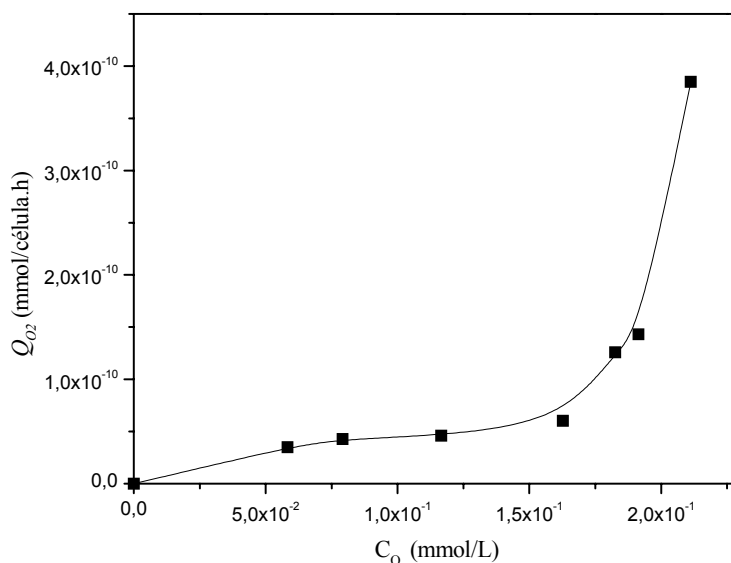


Figura 4.28. Variação Q_{O_2} com a concentração de oxigênio dissolvido (C_{O_2}) das células rS2 no experimento E11-rS2, com vazão de ar de 1 vvm para oxigenação superficial do frasco Schott de 100 mL, com volume de trabalho de 20 mL, meio Sf-900 II, temperatura de 28°C e agitação orbital de 100 rpm.

Estudos realizados por SWIECH (2005) com a linhagem recombinante das células de *Drosophila melanogaster* Schneider S2 utilizando um biorreator Applikon com volume de trabalho de 0,75 L, cultivadas em meio Sf-900 II com oxigênio dissolvido variando de 58 a 50% da saturação do ar na fase exponencial e com agitação crescente, demonstram que a viabilidade celular não foi afetada com o aumento da agitação (Figura 4.29). No entanto, como o volume de trabalho no biorreator é de 15 e 37,5 vezes maior que nos frascos Schott de 250 mL e 100 mL respectivamente, a interferência do eletrodo na velocidade específica de respiração celular foi menor que nos frascos Schott, com isso a velocidade específica de respiração celular inicial foi muito superior às obtidas nos frascos Schott (Figura 4.30). Por outro lado, apresentou o mesmo formato de decréscimo da velocidade específica de respiração celular durante a fase de crescimento exponencial (Figura 4.30). Na Tabela 4.6 estão representados os valores de velocidades específicas de respiração celular e velocidades

específicas máximas de crescimento celular referentes aos experimentos E11-rS2, E7-rS2 e o trabalho de SWIECH (2005).

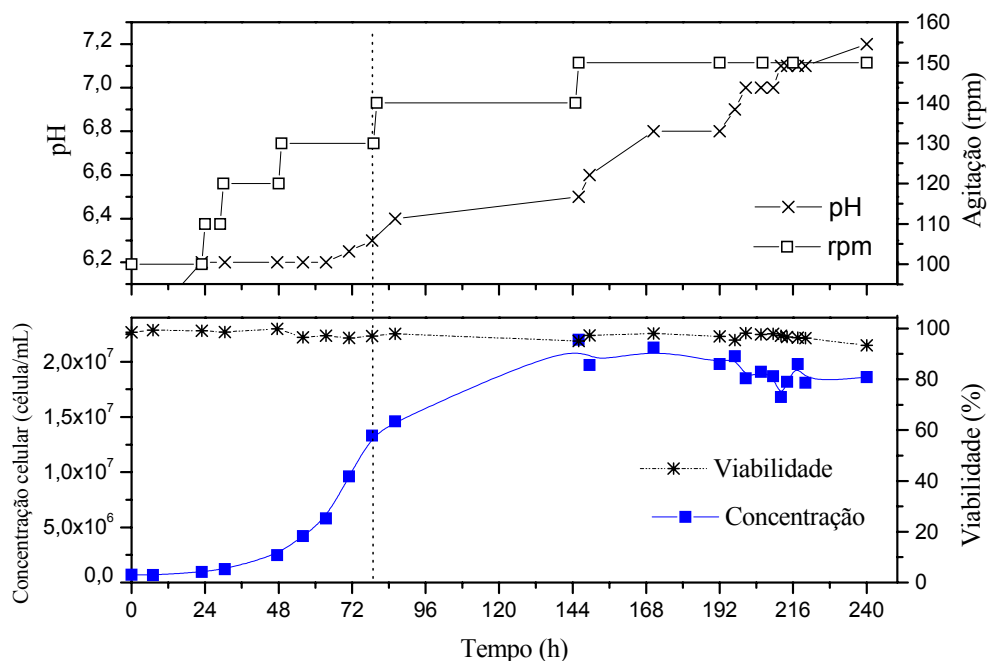


Figura 4.29. Variação de pH, agitação, viabilidade e crescimento celular das células rS2 cultivadas em meio Sf-900 II no biorreator Applikon, com volume de trabalho de 0,75 L em função do tempo de cultivo celular. Gráfico adaptado dos estudos realizados por SWIECH (2005).

Tabela 4.6. Valores de Q_{O_2} no início e final da fase de crescimento exponencial das células rS2 na presença de eletrodo de oxigênio dissolvido para diferentes volumes de trabalho.

Experimento	Volume de trabalho (mL)	Q_{O_2} inicial (mmol/célula.h)	Q_{O_2} final (mmol/célula.h)	μ_{max} (h ⁻¹)
E7-rS2(*)	50	$6,08 \times 10^{-9}$	$0,122 \times 10^{-9}$	0,053
E11-rS2(**)	20	$0,39 \times 10^{-9}$	$0,043 \times 10^{-9}$	0,032
SWIECH (2005)	750	$22,9 \times 10^{-9}$	$4,71 \times 10^{-9}$	0,051

(*) com eletrodo galvânico.

(**) com eletrodo polarográfico.

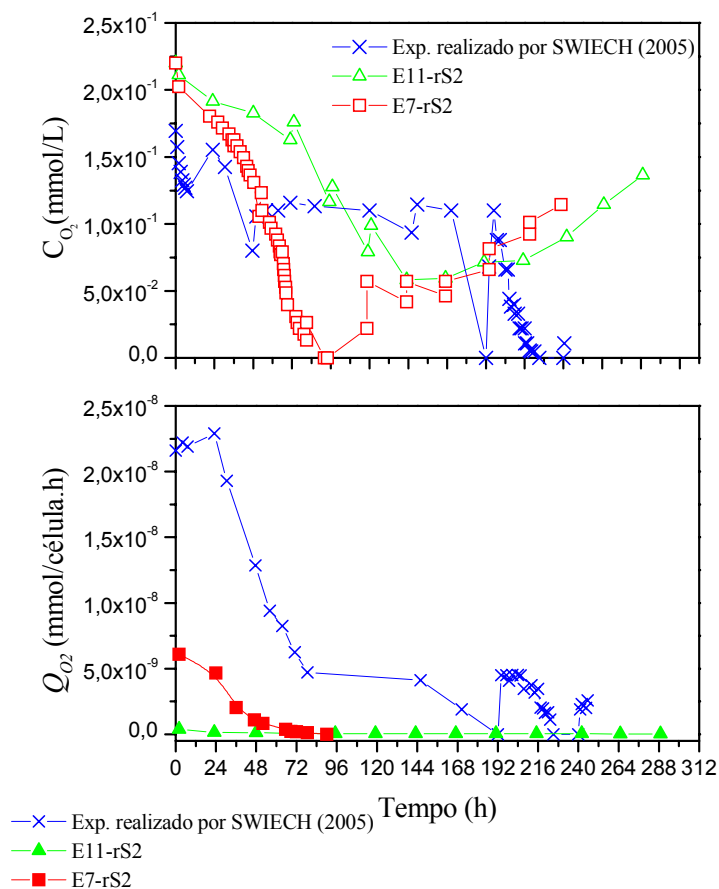


Figura 4.30. Variação de Q_{O_2} das células rS2 e oxigênio dissolvido em função do tempo no experimento realizado por SWIECH (2005) e o experimento E11-rS2 e E7-rS2.

Como os resultados iniciais dos experimentos não foram satisfatórios e havendo a hipótese da interferência do eletrodo no crescimento celular, optou-se em realizar paralelamente experimentos com diferentes agitações como demonstrado na Tabela 4.5 com objetivo de avaliar o estresse por cisalhamento das células rS2 durante o cultivo.

Neste conjunto de experimentos com diferentes agitações, realizados paralelamente com experimento E11-rS2, pode-se observar (Figura 4.31) que durante a fase exponencial a viabilidade celular se manteve alta, entre 95 e 99% independente da agitação utilizada. Para o

experimento E13-rS2 na qual agitação foi de 90 rpm observa-se na Figura 4.31 e Tabela 4.6 que a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) e a concentração máxima de células foram inferiores aos demais experimentos. Segundo estudos realizados por CRUZ *et al.* (1998) com as células Sf-9, cultivadas em frasco Wheaton com volume de trabalho de 125 mL, meio Sf-900 II e uma agitação orbital de 80 a 250 rpm. O fato das células apresentarem uma baixa velocidade específica máxima de crescimento celular para baixa agitação (80 rpm) pode ser atribuído à baixa transferência de oxigênio e alta concentração de gás carbônico no meio de cultivo. No entanto, o experimento (E13-rS2) manteve-se com a viabilidade alta, entre 95 e 99%, durante 408 horas (17 dias) de cultivo. Como a velocidade específica máxima de crescimento celular foi baixa em relação aos outros experimentos (E11-rS2, E12-rS2 e E14-rS2) provavelmente o experimento E13-rS2 deve ter atingido a fase estacionária com um nível de concentração de nutrientes solúveis ainda altos no meio de cultivo, assim permitindo a longa duração do experimento E13-rS2.

No experimento E14-rS2 com agitação orbital de 120 rpm observa-se na Figura 4.31 e Tabela 4.6 que a velocidade específica máxima de crescimento celular foi superior aos demais experimentos realizados paralelamente, este fato deve estar relacionado a uma melhor transferência de oxigênio para o meio de cultivo devido à agitação (120 rpm). A viabilidade celular monitorada pelo método de exclusão de corante azul de Tripán não apresentou nenhum indicativo de que as células estariam sofrendo algum tipo de estresse por cisalhamento, também não foi observado no microscópio fragmento de células no caldo de cultivo que seria um indicativo de cisalhamento ou lise de células. Entretanto, pode-se observar na Figura 4.31 uma menor duração com 308 horas (12,8 dias), provavelmente devido ao esgotamento de algum nutriente importante (glicose) do meio de cultivo.

Nos experimentos E11-rS2 (com eletrodo) e E12-rS2 (sem eletrodo) observa-se que as velocidades específicas de crescimento celular foram praticamente iguais (Tabela 4.7). No entanto, as concentrações máximas de células foram diferentes, logo se observa uma menor duração do cultivo E11-rS2 (289 horas) em relação aos demais experimentos. Este fato deve estar relacionado ao esgotamento de nutriente (glicose) no meio de cultivo, pois não foi observada uma queda na viabilidade ou fragmentos de células que pudesse indicar cisalhamento devido à presença do eletrodo.

O experimento E12-rS2 apresenta o mesmo crescimento celular do experimento E10-rS2 realizado (Figura 4.18 e Tabela 4.4) no frasco Schott de 250 mL com agitação de 100 rpm. Indicando provavelmente assim, uma limitação por uma baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo no final da fase exponencial.

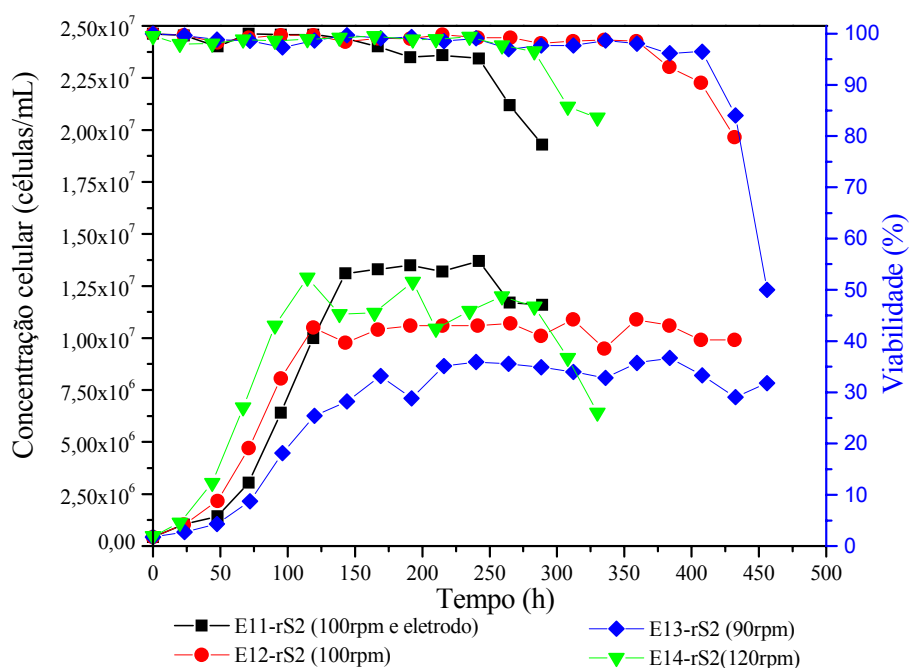


Figura 4.31. Resultados do crescimento e viabilidade celular das células rS2 nos experimentos realizados com diferentes agitações (90, 100 e 120 rpm) utilizando o frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tabela 4.7. Resultados obtidos nos experimentos com células rS2 utilizando frasco Schott de 100 mL e diferentes condições de agitação, em relação a μ_{max} e concentração máxima de células.

Experimentos	Características	μ_{max} (h ⁻¹)	Concentração máxima de células (células/mL)
E11-rS2	Vazão de ar 1 vvm para oxigenação superficial, agitação orbital de 100 rpm, com eletrodo.	0,032	1,33 x 10 ⁷
E12-rS2	Sem eletrodo, agitação orbital de 100 rpm e sem oxigenação superficial.	0,031	1,05 x 10 ⁷
E13-rS2	Sem eletrodo, agitação orbital de 90 rpm e sem oxigenação superficial.	0,024	0,87 x 10 ⁷
E14-rS2	Sem eletrodo, agitação orbital de 120 rpm e sem oxigenação superficial.	0,040	1,29 x 10 ⁷

O conjunto de experimentos realizado demonstra que a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo foi um fator limitante para o crescimento celular das células rS2. No entanto, outro fator não identificado deve estar limitando o crescimento celular das células rS2, pois os cultivos apresentam uma fase estacionária longa entre 140 e 240 horas com viabilidade celular alta, entre 95 e 99%. No entanto, a hipótese de cisalhamento das células e que seria a mais provável, não foi possível ser confirmada pelo método de exclusão do corante azul de Tripán. Logo a utilização de outro método como o que utiliza o substrato azocaseína para detecção de protease celular, proveniente do cisalhamento de células poderia ser empregado para identificar o efeito do cisalhamento celular durante no crescimento celular e o estresse celular.

5. CONCLUSÕES

Como conclusões relevantes da pesquisa realizada pode-se dizer que:

1. Na tentativa de definir uma metodologia para quantificar a viabilidade celular das células de insetos, ambos os métodos utilizados nos experimentos para acompanhar a viabilidade do cultivo das células S2 e rS2, o de exclusão de corante azul de Tripan e o de corantes fluorescentes, se mostraram rápidos, simples e confiáveis para identificação da porcentagem de células viáveis. Entretanto, à diferença do método de exclusão de corante, o método de corantes fluorescentes é capaz de identificar apoptose, logo, pode identificar com antecedência fatores adversos ao crescimento das células, como hipoxia ou esgotamento de algum nutriente que possa limitar a longevidade da cultura da célula de inseto.

2. O estudo do consumo de aminoácidos e glicose pelas células S2 e rS2 mostrou que estes nutrientes não estão relacionados à desaceleração do seu crescimento, pois se encontram em altas concentrações no meio de cultivo Sf-900 II ainda na fase estacionária. Sendo assim, a falta de oxigênio pode ser considerada a causa mais provável dessa desaceleração.

3. Nos experimentos realizados para verificar a influência da idade e concentração do inóculo, verificou-se que ambos os parâmetros não tem influência na velocidade específica de crescimento (μ). A influência ocorre na fase lag do crescimento celular; quanto menor a concentração do inóculo mais prolongada é a fase lag do cultivo. Em função disso, a idade do inóculo apresentou efeitos substanciais apenas na produtividade máxima das células rS2.

4. Os experimentos onde foi monitorada a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo das células S2 e rS2 demonstraram que o cultivo atinge a fase estacionária com nível muito baixo de oxigênio, sendo o fator limitante do crescimento das células. O

excesso de oxigênio na fase inicial do cultivo também foi prejudicial para o crescimento das células.

5. Os resultados dos experimentos com medidas da velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) demonstram que este parâmetro, para as células S2 e rS2, apresenta decréscimo acentuado durante a fase exponencial de crescimento celular.

6. A velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) obtida em cultivo realizado em frasco Schott de 100 mL apresentou-se 15 vezes menor que em cultivos realizados no frasco Schott de 250 mL evidenciando uma interferência do eletrodo no cultivo das células.

7. Os experimentos de cultivo realizados em diferentes agitações (90, 100 e 120 rpm) demonstraram que para baixa agitação a transferência de oxigênio é um fator limitante no crescimento celular. A viabilidade celular para todos os experimentos realizados em diferentes agitações se manteve alta, entre 95 e 99% de células viáveis indicando que as células aparentemente estão em bom estado fisiológico.

6. SUGESTÕES

Para os futuros trabalhos que venham a ser desenvolvidos sobre o estudo da fisiologia celular do cultivo das células S2 e rS2 são propostas as seguintes sugestões:

1. Reavaliar a concentração de células apoptóticas após 96 horas de cultivo das células S2 e rS2, utilizando outros métodos de identificação de células apoptóticas como o de citometria de fluxo.
2. Estudar o consumo de outros componentes como carboidratos (trealose, frutose, maltose) e a produção de lactato, amônia e da proteína recombinante. No quais podem ser limitantes para o crescimento das células das células rS2.
3. Avaliar o efeito do cisalhamento celular nos cultivos em frasco Schott de 100 mL e 250 mL, com a presença do eletrodo e sem a presença do eletrodo, através do método de espectroscopia utilizando o substrato azocaseína, para identificar protease provindas das células lisadas.
4. Determinar um modelo para velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) em função da concentração de oxigênio (C_{O_2}) para concentração deste, entre 0 e 50%.

Referências Bibliográficas

ABASTADO, J. P.. Apoptosis: function and regulation of cell death. *Research Immunology*, v. 147: p. 443 - 456, 1996.

ABRAMS, J. M.. An Emerging Blueprint for Apoptosis in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology*, v. 9: p. 435 - 440, 1999.

AL-RUBEAI, M.. Controlling Apoptosis to Improve Biopharmaceutical Production disponível <http://www.celldeath_apoptosis.org/batch_culture.htm> acessado 14/11/2004.

AL-RUBEAI, M.; SINGH, R. P.. Apoptosis in Cell Culture. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 9: p. 152 - 156, 1998.

AGATHOS, S. N.. Insect Cell Bioreactors. *Cytotechnology*, v. 20: p. 173 - 189, 1996.

ARANTES, M. K.. Identificação de Fatores Metabólicos-chave da *Drosophila melanogaster* S2 Visando à Realização de Cultivo com Alta Produtividade Celular. Programa Unificado de Iniciação Científica - PUIC. UFSCar, 2004.

BANEYX, F.. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 10: p. 411 - 421, 1999.

BÉDARD, C.; PERRET, S.; KAMEN, A.. Fed-Batch Culture of Sf-9 Cells Supports 3×10^7 Cells per ml and Improves Baculovirus-Expressed Recombinant Protein Yields. *Biotechnology Letters*, v. 19: p. 629 - 632, 1997.

BÉDARD, C.; TOM, R.; KAMEN, A.. Growth, Nutrient Consumption, and End-Product Accumulation in Sf-9 and BTI-EAA Insects Cell Culture: Insights into Growth Limitation and Metabolism. *Biotechnology Progress*, v. 9: p. 615 - 624, 1993.

BELLOSTA, P.; COSTA, M.; LIN, D. A.; BASILICO, C.. The Receptor Tyrosine Kinase ARK Mediates Cell Aggregation by Homophilic Binding. *Molecular and Cellular Biology*, v. 15: p. 614 - 625, 1995.

BENTING, J.; LECAT, S.; ZACCHETTI, D.; SIMONS, K.. Protein Expression in *Drosophila* Schneider Cells. *Analytical Biochemistry*, v. 278: p. 59 - 68, 2000.

BHATIA, R.; JESIONOWSKI, G.; FERRANCE, J.; ATAAI, M.. Insect Cell Physiology. *Cytotechnology*, v. 24: p. 1 - 9, 1997.

Bioagency, Apoptose&Inflamação, disponível < http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose_2004.pdf>Acessado 14/11/2004.

BRIGHTY, D. W.; ROSENBERG, M.. A Cis-acting Repressive Sequence that Overlaps the Rev-responsive Element of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Regulates Nuclear Retention of *env* mRNAs Independently of Known Splice Signals. *Biochemistry*, v. 91: p. 8314 - 8318, 1994.

BRIGHTY, D. W.; ROSENBERG, M.; CHEN, I. S. Y.; IVEY-HOYLE, M.. Envelope Proteins from Clinical Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 that are Refractory to Neutralization by Soluble CD4 Possess High Affinity for the CD4 Receptor. *Biochemistry*, v. 88: p. 7802 - 7805, 1991.

CARTWRIGHT, T.. *Animal Cells as Bioreactors*. Cambridge University Press, p. 184, 1994.

CARON, A. W.; TOM, R. L.; KAMEN, A. A.; MASSIE, B.. Baculovirus Expression System Scale up by Perfusion of High-Density Sf-9 Cell Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43: p. 881 - 891, 1994.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M.. Applications of Yeast in Biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10: p. 422 - 427, 1999.

CHA, H. J.; SHIN, S. S.; LIM, H. J.; CHO, S. H.; DATAL, N. N.; PHAM, M. Q.; BENTLEY, W. E.. Comparative Production of Human Interleukin-2 Fused with Green Fluorescent Protein in Several Recombinant Expression Systems. *Biochemical Engineering Journal*, v. 24: p. 225 - 233, 2005.

CHAN, L. C. L.; GREENFIELD, P. F., REID, S. Optimizing Fed-Batch Production of Recombinant Proteins Using the Baculovirus Expression Vector System. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59: p. 178 - 188, 1998.

CHEN, Q.; MA, E.; BEHAR, K.L.; XU, T.; HADDAD, G. G.. Role of Trehalose Phosphate Synthase in Anoxia Tolerance and Development in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277: p. 3274 - 3279, 2002.

CHEN, O.; BAHAR, K.L.; XU, T.; FAN, C.; HADDAD, G.G., Expression of *Drosophila* Trehalose-phosphate Synthase in HEK-293 Cells Increases Hypoxia Tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, v.49, p. 49113-49118, 2003.

CLEM, D. L.. Scale-Up of Protein Production in a Stirred Bioreactor. in *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York, p. 241. 1992.

COLL, J.M., The Glycoprotein G of Rhabdoviruses. *Archive Virology*. v.140, p. 827–851. 1995.

COSTA, W. A.; ÁVILA, C. A.; VALENTINE, E. J. G.; REICHMANN, M. L. A. B.; CUNHA, R. S.; GUIDOLIN, R.; PANACHÃO, M. R. I.; OMOTO, T. M.; BOLZAN, V. L.. *Manual Técnico do Instituto Pasteur: Profilaxia da Raiva Humana*. 2^a ed. São Paulo, Instituto Pasteur, 2000.

COUREY, A. J.; TIJAN, R.. Analysis of Sp1 in Vivo Reveals Multiple Transcriptional Domains, Including a Novel Glutamine-rich Activation Motif. *Cell*, v. 55: p. 887 - 898, 1998.

COWGER, N. L.; O'CONNOR, K. C.; HAMMOND, T. G.; LACKS, D. J.; NAVAR, G. L.. Characterization of Bimodal Cell Death of Insect Cells in a Rotating-Wall Vessel and Shaker Flask. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64: p. 14 - 16, 1999.

CRUZ, P. E.; PEIXOTO, C. C.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Production and Quality Analysis of Pr55gag Particles Produced in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 72: p. 149 - 158, 1998.

DEML, L.; WOLF, H.; WAGNER, R.. High Level Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen in Stably Transfected *Drosophila* Schneider-2 Cells. *Journal of Virological Methods*, v. 79: p. 191 - 203, 1999.

DONALDSON, M.; WOOD, A. H.; KULAKOSKY, P. C.; SHULER, M. L.. Glycosylation of a Recombinant Protein in the Tn5B1-4 Insect Cell Line: Influence of Ammonia, Time of Harvest Temperature, and Dissolved Oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63: p. 255 - 262, 1999.

DOYLE, A. & GRIFFITHS, J. B. (eds.). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. Chichester, Wiley, p. 332, 1988.

DOVERSKOG, M.; LJUNGGREN, J.; ÖHMAN, L.; HÄGGSTRÖM, L.. Physiology of Culture Animal Cells. *Journal of Biotechnology*, v. 59: p. 103 - 115, 1997.

DOVERSKOG, M.; BERTRAM, E.; LJUNGGREN, J.; OHMAN, L.. Cell Cycle Progression in Serum-Free Cultures of Sf9 Insect Cells: Modulation by Conditioned Medium Factors and Implications for Proliferation and Productivity. *Biotechnology Progress*, v. 16: p. 837 - 839, 2000.

DREWS, M.; PAALME, T.; VILU, R.. The Growth and Nutrient Utilization of the Insect Cell Line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in Batch and Continuous Culture. *Journal of Biotechnology*, v. 40: p. 187 - 198, 1995.

ELIAS, C. B.; ZEISER, A.; BÉDARD, C.; KAMEN, A. A. Enhanced Growth of Sf-9 Cells to a Maximum Density of 5.2×10^7 Cells per mL and Production of β -Galactosidase at High Cell Density by Fed Batch Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68: p. 381 - 388, 2000.

FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss, 3 ed., 1994.

GETLER, F. B.; COMER, A. R.; JAUNG, J. L.; AHERN, S. M.; CLARK, M. J.; LIEBL, E. C.; HOFFAMANN, F. M.. Enabled, a Dosage-sensitive Suppressor of Mutations in the *Drosophila* Abl Tyrosine Kinase, Encodes an Abl Substrate with SH3 Domain-binding Properties. *Genes Development*, v. 9: p. 512- 533, 1995.

GOOSEN, M. F. A.; DAUGULIS, A. J.; FAULKNER, P.. *Insect cell culture engineering*. Marcel Dekker, Inc. p. 56. New York, 1993.

GOSWAMI, J.; SINSKEY, A. J.; STELLER, H.; STEPHANOPOULOS, G. N.. Apoptosis in Batch Cultures of Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 62: p. 632 - 640, 1998.

GOTOH, T.; YOSHINORI, M.; CHIBA, K.; KIKUCHI, K.. Significant Increase in Recombinant Protein Production of a Virus-Infected Sf-9 Insect Cell of Low MOI under Low Dissolved Oxygen Conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94: p. 426 - 433, 2002.

GOTOH, T.; CHIBA, K.; KIKUCHI, K.. Oxygen Consumption Profiles of Sf-9 Insect Cells and their Culture at Low Temperature to Circumvent Oxygen Starvation. *Biochemical Engineering Journal*. v.7: p. 71 -7 8, 2004.

GUPTA, P., K; SAMEER, S., SAMEER, S. W.; CHATURVEDI, V.K.; RAUT, A. A.; PATIAL, P.; RAI, A.; PANDEY, K. D.; SAINI, M.. Immunogenic and Antigenic Properties of Recombinant Soluble Glycoprotein of Rabies Virus. *Veterinary Microbiology*, v. 108: p. 207 - 214, 2005.

HENSLER, W.; AGATHOS, S. N.. Evaluation of Monitoring Approaches and Effects of Culture Conditions on Recombinant Protein Production in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Cytotechnology*, v. 15: p. 177 - 186, 1994.

HENSLER, W.; SINGH, V.; AGATHOS, S. N.. Sf9 Insect Cell Growth and β -Galactosidase Production in Serum and Serum-free Media. Reprinted from *Biochemical Engineering VIII*, v. 745 of the *Annals of the New York Academy of Sciences*, November 30, 1994.

HETZ, S. K.; BRADLEY, T. J.. Insects Breathe Discontinuously to Avoid Oxygen Toxicity. *Letters to Nature*, v. 433: p. 516 - 519, 2005.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N.. Insect cell for Industrial Production of Recombinant Proteins. *Apply Microbiology Biotechnology*, v. 62: p. 1 - 20, 2003.

IKONOMOU, L.; BASTINI, G.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N.. Effect of Partial Medium Replacement on Cell Growth and Protein Production for the High-Five™ Insect Cell Line. *Cytotechnology*, v. 44: p. 67 - 76, 2004.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. Instruction Manual - Growth and Maintenance of Insect Cells Lines. Insect Cell Lines, Version K, 2002.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. - *Drosophila* Expression System – Version H, 2003.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES.Sf-900 II SFM– Form No. 3408. 2003.

IVEY-HOYLE, M.. Recombinant Gene Expression in Cultured *Drosophila melanogaster* Cells. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 2: p. 704 - 707, 1991.

JIAO, Z.; WENSONG, T.; JUNTANG, Y.. On line Estimation of Oxygen uptake Rate for Insect Cells Growing in a Modified Spinner Flask. *Biotechnology Techniques*, v. 11: p. 755 - 758, 1997.

JOHANSON, K.; APPELBAUM, E.; DOYLE, M.; HENSLEY, P.; ZHAO, B.; ABDELMEGUID, S.S.; YOUNG, P.; COOK, R.; CARR, S.; MATICO, R.; CUSIMANO, D.; DUL, E.; ANGELICHIO, M.; BROOKS, I.; WINBRONE, E.; MCDONNELL, P.; MORTON, T.; BENNETT, D.; SOKOLOSKI, T.; MCNULTY, D.; ROSENBERG, M.; CHAINKEN, I.. Binding Interactions of Human Interleukin 5 with Its Receptor α Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270: p. 9459 - 9471, 1995.

KAMEN, A. A.; BÉDARD, C.; TOM, R.; PERRET, S.; JARDIN, B.. On-Line Monitoring of Respiration in Recombinant-Baculovirus Infected and Unfected Insect Cell Bioreactor Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 50: p. 36 - 48, 1996.

KEITH, M. B.; FARRELL, P. J.; IATROU, K.; BEHEIE, L. A.. Screening of Transformed Insect Cell Lines for Recombinant Protein Production. *Biotechnology Progress*, v. 15: p. 1046 - 1052, 1999.

KIKPARTRICK, R. B.; GANGULY, S.; ANGELICHIO, M.; GRIEGOL, S.; SHATZMAN, A.; SILVERMAN, C.; ROSENBERG, M.. Heavy Chain Dimers as Well as Complete Antibodies are Efficiently Formed and Secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270: p. 19800 - 19805, 1995.

KIOUKIA, N.; NIENOW, A.W.; EMERY, A.N.; AL-RUBEAI, M.. Physiological and Environmental Factors Affecting the Growth of Insect Cells and Infection with Baculovirus. *Journal of Biotechnology*, v. 38: p. 243 - 251, 1995.

KONSTANTINOV, K.B. Monitoring and Control of the Physiological State of Cell Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 52: p. 271 - 289, 1996.

MARQUES, F. H.. Influência do oxigênio dissolvido na produção de poliedro de baculovirus por células de inseto em biorreator. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade do Estado de São Paulo - USP, 2005.

MARANGA, L.; COROADINHA, A. S.; CARRONDO, M. J. T. Insect Cell Culture Medium Supplementation with Fetal Bovine Serum and Bovine Serum Albumin: Effects on Baculovirus Adsorption and Infection Kinetics. *Biotechnology Progress*, v. 18: p. 855 - 861, 2002.

MENESES-ACOSTA, A.; MENDONÇA, R. Z.; MERCHANT, H.; COVARRUBIAS, L.; RAMÍREZ, O. T. Comparative Characterization of Cell Death between Sf9 Insect Cells and Hybridoma Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72: p. 442 - 457, 2001.

MENDONÇA, R. Z.; PALOMARES, L. A.; RAMÍREZ, O. T.. An Insight Into insect Cell Metabolism through Selective Nutrient Manipulation. *Journal of Biotechnology*, v. 72: p. 61 - 75, 1999.

MERCILLE, S.; MASSIE, B. Induction of Apoptosis in Nutrient-Deprived cultures of Hybridoma and Myeloma Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44: p. 1140-1154, 1994.

MILLER, D.W.; SAFER, P.; MILLER, L.K. An Insect Baculovirus Host-Vector System for High-Level Expression of Foreign Genes. In *Genetic Engineering: principles and Methods*, Plenum Press, New York, p. 277, 1986.

NEVES, A. A.; PINTO, L. S. VIEIRA, L. M.; MENEZES, J. C.. Monitorização de Processos Biológicos: I Monitorização *in-situ* e On-line da Concentração Celular em Bioprocessos Industriais. *Boletim de Biotecnologia*, v. 68: p. 20 - 25, 2001.

RADFORD, K. M.; REID, S.; GREENFIELD, P. F.. Substrate Limitation in the Baculovirus Expression Vector System. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 56: p. 32 - 44, 1997.

REVEUNY, S.; KEMP, C. W.; SHILOACH, J.. Carbohydrate Metabolism in Insect Cell Cultures During Cell Growth and Recombinant Protein Production. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 665: 230 – 237, 1992.

REVEUNY, S.; KIM, U. J.; KEMP, C. W.; SHILOACH, J. Production of Recombinant Proteins in High-Density Insect Cell Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42: p. 235 - 239, 1993.

RHIEL M.; MURHAMMER, D. W.. The Effect of Oscillating Dissolved Oxygen Concentrations on the Metabolism of a *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE Clonal Isolate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 47: p. 640 - 650, 1995.

RHIEL M.; MITCHELL-LOGEAN, C. M.; MURHAMMER, D. W. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High FiveTM) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 Insect Cell Line Metabolism in Suspension Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55: p. 909 - 920, 1997.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H. N.; MARTINEZ, C. H.. Técnicas Básicas de Cultura Celular. Instituto Butantan e Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1983.

RUFFIEUX, P.; STOCKAR, U. V.; MARISON, I. W.. Measurement of Volumetric (OUR) and Determination of Specific (qO_2) Oxygen Uptake Rates in Animal Cell Cultures. *Journal of Biotechnology*, v. 63: p. 85 - 95, 1998.

SAKAMOTO, S.; IDE, T.; TOKIYOSHI, S.; NAKAO, J.; HAMADA, F. YAMAMOTO, M.; GROSBY, J. A.; NI, Y.; KAWAI, A.. Studies on the Structures and Antigenic Properties of Rabies Virus Glycoprotein Analogues Produced in Yeast Cells. *Vaccine*, v. 17: p. 205 – 218, 1999.

SANDERSON, C. S.; BARFORD, J. P.; BARTON, G. W.; WONG, T.K.K.; REID, S.. A Structured, Dynamic Model for Animal Cell Culture: Application to Baculovirus/Insect Cell Systems. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3: p. 219 - 229, 1999.

SCHIMD, G.. Insect Cell Cultivation: Growth and Kinetics. *Cytotechnology*, v. 20: p. 43 - 56, 1996.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.. *Biotecnologia Industrial*, v. 2: p. 277-308, 2001. Editora Edgard Blücher Ltda.

SCHNEIDER, I.. Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal Embryology. Express Morphology*, v. 27: p. 363 - 365.

SILVA, G. M. C.. Contribuição ao Desenvolvimento de Metodologia para Detecção de Desintegrina Recombinante Produzida em Cultivos de Células CHO-K1. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, 2004.

SIMPSON, N. H.; MILNER, A. E.; AL-RUBEAI, M.. Prevention of Hybridoma Cell Death by *bcl-2* During Suboptimal Culture Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54: p. 1 - 16, 1997.

SIMPSON, N. H.; SINGH, R. P.; PERANI, A.; GOLDENZON, C.; AL-RUBEAI, M.. In Hybridoma Culture, Deprivation of Any Single Amino Acid Leads to Apoptotic Death, Which is Suppressed by the Expression of the *bcl-2* Gene. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59: p. 90 - 98, 1998.

SINGH, R. P.; AL-RUBEAI, M.; GREGORY, C. D.; EMERY, A. N.. Cell Death In Bioreactors: A Role for Apoptosis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44: p. 720 - 726, 1994.

SINGH, R. P.; EMERY, A. N.; AL-RUBEAI, M.. Enhancement of Survivability of Mammalian Cells by Over expression of the Apoptosis-Suppressor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.52: p. 166 - 175, 1996.

SINGH, R. P.; FINKA, G.; EMERY, A. N.; AL-RUBEAI, M.. Apoptosis and its Control in Cell Systems. *Cytotechnology*, v. 23: p. 87 - 93, 1997.

SONDERGAARD, L.. *Drosophila* Cells can be Grown to High Cell Densities in a Bioreactor. *Biotechnology Techniques*, v. 10: p. 161 - 166, 1996.

SUMMERS, M. D.; SMITH, G.E.. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agricultural Station, Texas, 1987.

STAVROULAKIS, D. A.; KALOGERAKIS, N.; BEHIE, L. A.. Kinetic Data for the BM-5 Insect Cell Line in Repeated-Batch Suspension Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38: p. 116 - 126, 1991.

SWIECH, K.; Cultivo de Células *Drosophila melanogaster* S2 em Biorreator. Doutorado em andamento, 2005.

TATICEK, R. A.; SHULER, M. L.. Effect of Elevated Oxygen and Glutamine Level on Foreign Protein Production at High Cell Densities Using the Insect Cell-baculovirus Expression System. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54: p. 142 - 152, 1995.

TATICEK, R. A.; CHOI, C.; PHAN, S-E.; PALOMARES, L. A.; SHULER, M. L. Comparison of Growth and Recombinant Protein Expression in Two Different Insect Lines in Attached and Suspension Culture. *Biotechnology Progress*, v. 17: p. 676 - 688, 2001.

TOTA, M. R.; XU, L.; SIROTINA, A.; STRADER, C. D.; GRAZIANO, M. P.. Interaction of Fluorescein-Trp Glucagons with the Human Glucagons Receptor Expressed in *Drosophila* Schneider 2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270: p. 6466 – 26472, 1995.

VALLE, M. A.; KESTER, M. B.; BURNS, A. L.; MARX, S. J.; SPIEGEL, A. M.; SHILOACH, J.. Production and Purification of Human Menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells Using Stirred Tank Reactor. *Cytotechnology*, v. 35: p. 127 - 135, 2001.

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

WHITE, K.; STELLER, H.. The Control of Apoptosis in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology*, v. 5: p. 74 - 78, 1995.

WU, J.; RUAN, Q.; LAM, H.Y.P.. Evaluation of Spent Medium Recycle and Nutrient Feeding Strategies for Recombinant Protein Production in the Insect Cell-baculovirus Process. *Journal of Biotechnology*, v. 66: p. 109-116, 1998.

YELVERTON, E.; NORTON, S.; OBIJESKI, J. F.; GOEDDEL, D. V.. Rabies Virus Glycoprotein Analogs: Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science*, v. 219: p. 614 – 619, 1983.

ZHANG, J.; COLLINS, A.; CHEN, M.; KNYAZEVA, I.; GENTZ, R.. High-Density Perfusion Culture of Insect Cells with a BioSep Ultrasonic Filter. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59: p. 351 - 359, 1998.

APÊNDICE

Valores experimentais referentes aos experimentos realizados

Tabela A1 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E1-S2 utilizando as células S2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h)	Concentração celular (*10 ⁶ células/mL)	Viabilidade celular Método azul de Tripán (%)	Viabilidade celular Método fluorescência (%)
0,0	0,46	95,6	95,6
27,5	0,85	96,0	93,3
50,0	3,95	96,3	94,2
74,5	10,20	96,8	94,8
99,0	12,70	97,2	97,8
120,3	21,50	98,9	95,6
143,7	25,50	97,0	96,6
167,7	25,40	97,3	93,8
195,5	25,40	95,7	90,7
220,0	19,50	82,9	85,2

Tabela A2 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E1-S2 utilizando o método de corantes fluorescentes.

Tempo (h)	VNA (*) (%)	VA (%)	NVA (%)	NEC (%)	CF (%)
0,0	95,7	0,0	0,0	0,7	3,6
27,5	93,3	1,7	0,0	5,0	0,0
50,0	94,2	2,1	0,0	3,7	0,0
74,5	94,8	0,3	0,0	4,9	0,0
99,0	97,8	0,9	0,0	1,3	0,0
120,3	95,3	2,0	0,4	2,0	0,0
143,7	96,2	3,0	0,4	0,4	0,0
167,7	93,8	5,6	0,0	0,6	0,0
195,5	90,7	5,0	0,0	4,3	0,0
220,0	85,3	5,3	0,3	9,1	0,0

(*) Símbolo definido em materiais e método.

Tabela A3 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E2-rS2 utilizando as células S2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h)	Concentração Celular (*10 ⁶ células/mL)	Viabilidade Celular Método azul de Tripán (%)	Viabilidade Celular Método fluorescência (%)
0,0	0,34	98	98,3
23,5	0,70	94,8	96,5
47,8	3,98	97,2	95,9
68,8	10,00	95,2	97,0
96,8	16,20	96,6	97,9
121,0	16,30	96,8	98,1
144,5	16,30	97,4	100
167,5	16,10	96,5	95,4
186,3	15,00	90,6	93,2
210,7	16,40	90,9	89,8
236,5	14,40	80,6	75,9

Tabela A4 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E2-rS2 utilizando o método de corantes fluorescentes.

Tempo (h)	VNA (%)	VA (%)	NEC (%)
0,0	96,3	0,0	3,7
23,5	96,5	0,0	3,5
47,8	95,9	0,0	4,1
68,8	97,0	0,0	3,0
96,8	97,9	0,0	2,1
121,0	98,1	0,0	1,9
144,5	100	0,0	0,0
167,5	95,4	2,6	2,0
186,3	93,2	2,9	3,9
210,7	89,8	4,5	4,5
236,5	75,9	6,5	18,0

Tabela A5 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E3-S2 utilizando as células S2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h)	Concentração Celular (*10 ⁶ células/mL)	Viabilidade Celular Método azul de Tripán (%)	Viabilidade Celular Método fluorescência (%)
0,0	0,47	95,2	95,6
24,5	0,90	95,0	96,5
47,0	4,21	94,2	94,0
70,5	9,19	96,8	97,3
95,8	12,7	98,8	98,1
119,7	21,6	95,4	96,9
143,0	23,9	97,2	96,7
167,0	23,5	97,2	94,1
191,5	24,3	96,4	93,8
215,5	20,3	85,0	87,8

Tabela A6 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E3-S2 utilizando o método de corantes fluorescentes.

Tempo (h)	VNA (%)	VA (%)	NVA (%)	NEC (%)	CF (%)
0,0	95,6	0,0	0,0	0,7	3,7
24,5	96,5	0,6	0,3	1,5	1,1
47,0	94,0	0,2	0,2	4,4	1,2
70,5	97,2	0,0	0,2	2,6	0,0
95,8	98,1	1,0	0,0	0,7	0,2
119,7	96,9	2,8	0,0	0,3	0,0
143,0	96,7	2,7	0,0	0,0	0,6
167,0	94,1	5,1	0,0	0,8	0,0
191,5	93,8	3,8	0,2	1,7	0,5
215,5	87,8	5,4	0,5	6,3	0,0

Tabela A7 - Valores dos dados experimentais do consumo e produção de aminoácidos obtidos no experimento E3-S2 utilizando as células S2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h)	0	95,8	119,7	167	215,5
Aminoácido (g/L)					
Asp	1,415	1,110	1,330	0,836	0,909
Glu	1,769	1,190	0,875	0,503	0,550
Ser	0,727	0,130	0,086	0,041	0,005
Gly	0,621	0,483	0,431	0,398	0,384
His	0,699	0,169	0,129	0,127	0,106
Arg	0,825	0,830	0,754	0,681	0,650
Thr	0,263	0,231	0,171	0,119	0,113
Ala	1,262	3,130	3,620	4,012	2,660
Pro	0,386	0,001	0,000	0,000	0,002
Tyr	0,216	0,187	0,162	0,126	0,111
Val	0,609	0,548	0,443	0,315	0,276
Met	0,862	0,898	0,830	0,778	0,768
Cys	0,024	0,009	0,000	0,000	0,000
Ile	0,804	0,551	0,409	0,210	0,157
Leu	0,301	0,168	0,102	0,029	0,017
Phe	0,848	0,904	0,830	0,770	0,755
Lys	0,635	0,622	0,546	0,493	0,456

Tabela A8 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E4-rS2 utilizando as células rS2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h)	Concentração Celular (*10 ⁶ células/mL)	Viabilidade Celular Método azul de Tripán (%)	Viabilidade Celular Método fluorescência (%)
0,0	0,53	96,2	96,3
22,0	1,34	94,0	95,7
46,0	6,12	94,8	97,5
73,8	12,8	97,5	98,3
92,0	14,5	97,6	98,4
121,0	14,6	96,0	97,7
144,2	14,3	95,9	96,8
168,8	14,4	97,4	95,2
191,8	14,4	91,3	92,4
214,5	14,2	90,1	87,3
236,3	14,9	89,3	83,0
260,8	14,3	72,5	68,8

Tabela A9 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E4-rS2 utilizando o método de corantes fluorescentes.

Tempo (h)	VNA (%)	VA (%)	NEC (%)
0,0	96,3	0,0	3,7
22,0	95,7	0,0	4,3
46,0	97,5	0,0	2,5
73,8	98,3	0,0	1,7
92,0	98,4	0,0	1,6
121,0	97,7	0,0	2,3
144,2	96,8	0,0	3,2
168,8	95,2	4,8	0,0
191,8	92,4	3,5	4,1
214,5	87,3	6,1	6,6
236,3	83,0	11,0	6,0
260,8	68,8	8,6	21,6

Tabela A10 - Valores dos dados experimentais do consumo e produção de aminoácidos obtidos no experimento E4-rS2 utilizando as células S2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h) \ Aminoácido (g/L)	0	92	168,8	214,5	260,8
Glu	1,769	1,420	1,160	1,196	0,891
Ser	0,727	1,780	1,300	1,477	1,440
Gly	0,621	0,524	0,054	0,038	0,035
His	0,699	0,397	0,408	0,397	0,435
Arg	0,825	0,699	0,142	0,129	0,139
Thr	0,263	0,795	0,712	0,727	0,713
Ala	1,262	0,227	0,177	0,169	0,181
Pro	0,386	1,800	2,620	2,584	2,280
Tyr	0,216	0,292	0,002	0,013	0,010
Val	0,609	0,215	0,168	0,169	0,143
Met	0,862	0,600	0,520	0,524	0,525
Cys	0,025	0,860	0,800	0,829	0,826
Ile	0,804	0,019	0,011	0,012	0,013
Leu	0,301	0,785	0,639	0,607	0,594
Phe	0,848	0,274	0,181	0,164	0,147
Lys	0,635	0,833	0,809	0,841	0,836

Tabela A11-Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E5-rS2 utilizando as células rS2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h)	Glutamina (g/L)	Glicose (g/L)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	VNA (%)	VA (%)	Nec (%)
0,0	2,26	10,70	0,38	100	98,1	0,0	1,9
19,5	2,27	10,50	0,74	99,6	98,2	0,0	1,8
43,0	2,00	10,50	1,46	96,2	98,2	0,0	1,8
68,0	1,91	10,00	2,43	97,3	97,2	0,0	2,8
94,5	1,82	9,17	4,58	95,9	97,4	1,9	0,7
111,8	1,64	8,97	7,36	97,8	96,3	1,8	1,9
140,0	1,22	7,06	9,21	97,1	94,4	3,9	2,2
172,0	1,37	5,54	9,66	98,6	95,3	2,5	1,7
192,0	1,14	4,33	9,05	97,9	95,4	3,3	1,3
216,0	0,90	3,54	9,21	97,9	96,4	1,9	1,7
235,5	1,00	2,12	8,69	97,6	97,0	1,9	1,1
260,0	1,02	1,53	8,77	98,7	96,1	2,2	1,7
283,8	1,02	0,51	9,30	97,0	95,4	2,8	1,8
308,8	0,76	0,06	8,55	95,7	93,8	1,9	4,3
334,0	0,60	0,03	9,32	76,0	70,8	6,5	22,7

Tabela A12-Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E6-S2 utilizando as células rS2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

Tempo (h)	Glutamina (g/L)	Glicose (g/L)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	VNA (%)	VA (%)	Nec (%)
0,0	2,16	10,60	0,47	97,0	96,3	0,0	3,7
20,0	2,04	10,30	0,85	99,2	97,3	0,0	2,7
44,5	2,03	10,00	1,38	98,9	98,0	0,0	2,0
67,8	1,90	9,82	3,10	98,8	98,9	0,0	1,1
95,0	1,74	9,02	4,80	99,8	97,3	1,9	0,8
116,0	1,63	8,48	10,00	97,0	94,2	3,4	2,4
140,0	1,09	5,39	11,00	99,4	96,5	1,3	2,2
172,5	1,00	4,49	11,10	99,5	97,2	2,2	0,6
192,5	1,00	3,09	12,10	97,7	96,2	1,9	1,9
216,5	0,85	2,53	11,80	99,3	96,3	2,2	1,5
236,0	0,99	0,59	11,60	98,7	97,8	1,1	1,1
260,0	0,69	0,32	12,20	98,9	97,6	1,4	1,0
284,0	1,00	0,06	13,40	98,6	98,5	0,8	0,7
303,5	0,65	0,06	13,60	96,0	95,5	2,5	2,0
333,5	0,62	0,02	12,00	83,6	85,5	7,0	7,5

Tabela A13-Valores dos dados experimentais obtidos nos experimentos com planejamento fatorial utilizando as células rS2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C com volume de trabalho de 20 mL.

Tabela A

E1			E2		
Tempo (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	Tempo (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)
0,0	0,62	99,6	0,0	0,78	99,1
21,5	2,41	96,3	24,0	1,34	96,6
46,0	5,80	96,0	44,7	5,16	97,6
77,0	11,70	96,9	68,0	7,29	98,5
96,0	10,90	98,7	92,0	7,50	96,7
118,0	11,60	97,5	115,3	10,10	95,4
144,0	11,00	97,6	146,5	9,87	97,4
168,0	12,10	97,9	163,5	10,80	97,8
192,0	13,30	94,4	192,0	10,40	96,4
216,0	10,90	94,0	216,0	11,90	97,7
240,0	13,50	95,3	240,0	10,90	95,7
264,0	11,90	94,9	264,0	10,70	96,9

Tabela B

E3			E4		
Tempo (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	Tempo (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)
0,0	0,58	97,2	0,0	0,22	98,8
21,0	1,08	96,2	21,7	0,38	98,1
44,5	2,26	94,8	46,0	1,27	97,3
67,7	6,23	97,5	77,0	4,92	93,9
91,3	9,05	95,3	96,0	10,20	95,3
115,0	13,30	99,0	118,0	9,35	97,6
144,0	11,20	97,8	144,0	11,00	97,4
166,5	11,50	97,1	168,0	9,80	99,4
185,0	10,60	95,2	192,0	11,0	97,5
216,0	12,90	97,5	216,0	11,80	93,2
240,0	10,80	97,4	240,0	10,80	97,2
264,0	11,30	93,9	264,0	12,20	94,8

Tabela C

E5			E6		
Tempo (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	Tempo (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)
0,0	0,50	97,6	0,0	0,27	99,5
18,0	1,26	97,4	23,5	0,47	95,6
46,5	4,4	95,0	48,0	1,24	91,2
67,0	6,6	98,1	72,5	5,13	97,9
89,7	9,38	98,4	95,3	11,00	97,9
112,0	10,50	95,7	120,0	11,00	98,8
144,0	10,20	96,8	144,0	10,10	95,3
168,0	8,10	98,5	168,0	11,50	91,3
192,0	9,98	98,4	-	-	-
216,0	9,46	97,9	-	-	-
240,0	10,20	96,6	-	-	-
264,0	10,70	95,61	-	-	-

Tabela A14 -Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E7-rS2 utilizando as células rS2 cultivadas em frasco Schott de 250 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 50 mL.

t (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	t (h)	Q_{O_2} (*10 ⁻⁹ mmol/célula.h)	C_{O_2} (mmol/L)	Q_{O_2} (*10 ⁻⁹ mmol/célula.h)
0,0	0,51	99,5	2,0	6,08	0,20	6,08
24,0	1,11	98,2	24,0	4,67	0,18	4,67
36,0	2,12	99,5	36,0	2,04	0,16	2,04
47,0	3,52	98,0	47,0	1,09	0,13	1,09
52,0	4,18	97,5	52,0	0,83	0,11	0,83
65,5	8,48	96,6	65,5	0,38	0,08	0,39
81,0	12,40	97,0	68,8	0,20	0,04	0,21
94,0	12,60	96,7	72,0	0,18	0,04	0,18
118,5	13,70	98,8	78,5	0,12	0,02	0,12
143,0	13,80	98,0	90,0	0,00	0,00	0,00
167,5	13,30	94,0	-	-	-	-
194,0	13,90	94,8	-	-	-	-
219,0	16,50	81,5	-	-	-	-
238,5	13,10	83,3	-	-	-	-

Tabela A15 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E8-S2 utilizando as células S2 cultivadas em frasco Schott de 250 mL, meio Sf-900 II, agitação de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 50 mL.

t (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	t (h)	Q_{O_2} (*10 ⁻⁹ mmol/célula.h)	C_{O_2} (mmol/L)	Q_{O_2} (*10 ⁻⁹ mmol/célula.h)
0,0	0,59	99,4	1,5	4,82	0,19	4,82
24,0	2,12	98,3	13,0	1,49	0,17	1,49
38,0	4,82	99,0	18,0	1,17	0,15	1,17
50,0	8,22	99,5	24,0	1,06	0,14	1,06
71,5	13,40	99,2	36,0	0,46	0,11	0,46
93,0	16,00	97,2	38,0	0,41	0,10	0,41
111,5	21,50	98,0	42,0	0,28	0,09	0,28
134,0	25,90	97,3	44,0	0,26	0,07	0,26
158,0	22,50	96,5	48,0	0,14	0,06	0,14
186,5	21,20	98,0	50,0	0,17	0,06	0,17
213,5	21,30	66,6	57,0	0,12	0,04	0,12
239,0	13,60	49,5	71,5	0,10	0,01	0,10
-	-	-	84,0	0,00	0,00	0,00

Tabela A16 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E9-S2 utilizando as células S2 cultivadas em frasco Schott de 250 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 50 mL.

t (h)	X (*10 ⁶ células/mL)	Viab. (%)	t (h)	Q_{O_2} (*10 ⁻⁹ mmol/célula.h)	C_{O_2} (mmol/L)	Q_{O_2} (*10 ⁻⁹ mmol/célula.h)
0,0	0,47	99,1	0,0	7,69	0,26	7,69
16,5	0,58	99,8	16,5	6,14	0,26	6,14
27,5	0,85	99,5	27,5	4,02	0,23	4,02
39,5	1,19	99,6	39,5	3,09	0,26	3,09
48,0	1,62	97,0	48,0	2,00	0,26	2,00
65,0	2,73	98,5	65,0	0,94	0,24	0,94
72,0	4,05	98,6	72,0	0,50	0,21	0,50
88,5	5,48	98,5	88,5	0,32	0,20	0,32
96,0	6,75	98,1	96,0	0,29	0,19	0,29
118,0	10,30	99,0	118,0	0,18	0,18	0,18
138,0	12,20	99,5	138,0	0,12	0,16	0,12
161,5	14,10	98,7	161,5	0,10	0,13	0,10
185,5	16,80	97,5	185,5	0,08	0,11	0,08
211,5	17,60	98,7	211,5	0,04	0,09	0,04
232,5	18,60	96,9	232,5	0,01	-	-
262,0	16,70	92,0	262,0	0,01	-	-
281,0	11,40	66,4	-	-	-	-

Tabela A17 - Valores dos dados experimentais obtidos nos experimentos, E7-rS2, E8-S2 e E9-S2 utilizando as células S2 e rS2 cultivadas em frasco Schott de 250 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 50 mL.

E7-rS2		E8-S2		E9-S2	
t (h)	C _{O2} (mmol/L)	t (h)	C _{O2} (mmol/L)	t (h)	C _{O2} (mmol/L)
0,0	0,220	0,0	0,220	0,0	0,264
2,0	0,202	1,0	0,198	2,5	0,264
21,0	0,180	2,5	0,194	16,5	0,264
26,0	0,176	13,0	0,165	27,5	0,231
29,0	0,172	18,0	0,158	39,0	0,255
33,0	0,167	17,0	0,154	48,0	0,238
35,0	0,163	20,0	0,150	65,0	0,216
36,0	0,158	24,0	0,143	72,0	0,216
36,0	0,163	27,5	0,136	88,5	0,216
38,0	0,158	36,0	0,110	94,5	0,194
40,0	0,154	37,0	0,106	96,0	0,194
42,0	0,150	39,0	0,097	118,0	0,185
44,0	0,143	40,0	0,092	136,0	0,158
45,0	0,140	42,0	0,086	138,0	0,158
46,0	0,136	43,0	0,079	161,5	0,125
48,5	0,131	43,5	0,075	185,5	0,110
51,5	0,106	44,0	0,070	185,5	0,132
53,0	0,123	45,5	0,066	211,5	0,092
53,5	0,110	46,5	0,062	232,0	0,154
58,0	0,101	48,0	0,057	262,0	0,220
59,0	0,097	49,5	0,053	281,0	0,220
62,0	0,092	50,0	0,066	-	-
63,0	0,088	50,5	0,055	-	-
64,3	0,084	52,5	0,044	-	-
64,7	0,079	54,0	0,040	-	-
65,1	0,077	57,0	0,035	-	-
66,0	0,079	58,0	0,031	-	-
66,8	0,070	60,0	0,026	-	-
67,0	0,066	70,0	0,004	-	-
67,3	0,062	72,0	0,018	-	-
67,4	0,057	93,0	0,000	-	-
68,2	0,053	93,0	0,013	-	-
68,3	0,048	111,5	0,000	-	-
69,3	0,040	111,5	0,020	-	-
74,5	0,031	134,0	0,000	-	-
75,3	0,026	134,0	0,000	-	-
76,5	0,022	158,0	0,000	-	-
79,5	0,017	158,0	0,013	-	-
81,0	0,013	186,5	0,000	-	-
81,0	0,026	213,5	0,000	-	-

92,0	0,000	213,5	0,048	-	-
94,0	0,000	213,5	0,070	-	-
118,5	0,022	239,0	0,128	-	-
118,5	0,057	-	-	-	-
143,0	0,042	-	-	-	-
143,0	0,057	-	-	-	-
167,0	0,046	-	-	-	-
167,0	0,057	-	-	-	-
194,0	0,066	-	-	-	-
194,0	0,081	-	-	-	-
219,0	0,092	-	-	-	-
219,0	0,101	-	-	-	-
238,5	0,114	-	-	-	-

Tabela A18 - Valores dos dados experimentais obtidos no experimento E11-rS2 utilizando as células rS2 cultivadas em frasco Schott de 100 mL, meio Sf-900 II, agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 28°C e com volume de trabalho de 20 mL.

t (h)	X (*10 ⁶ cell/mL)	Viab. (%)	t (h)	Q _{O₂} (*10 ⁻¹⁰ mmol/célula.h)	C _{O₂} (mmol/L)	Q _{O₂} (*10 ⁻¹⁰ mmol/célula.h)	t (h)	C _{O₂} (mmol/L)
0,0	0,44	100	2,0	3,85	0,211	3,85	0,0	0,220
23,0	1,03	99,6	23,0	1,43	0,191	1,43	2,0	0,211
48,0	1,44	97,5	48,0	1,26	0,183	1,26	23,0	0,191
71,0	3,05	100	71,0	0,60	0,163	0,60	48,0	0,183
95,0	6,41	99,8	95,0	0,46	0,117	0,46	71,0	0,163
119,0	10,00	99,8	119,0	0,43	0,079	0,43	73,0	0,176
143,0	13,10	99,0	143,0	0,35	0,058	0,35	95,0	0,117
167,0	13,30	97,5	167,0	0,38	-	-	97,0	0,128
191,0	13,50	95,4	191,0	0,48	-	-	119,0	0,079
215,0	13,20	95,8	215,0	0,46	-	-	121,0	0,099
242,0	13,70	95,1	242,0	0,42	-	-	143,0	0,058
265,0	11,70	86,0	265,0	0,30	-	-	167,0	0,059
289,0	11,60	78,3	289,0	0,32	-	-	191,0	0,072
-	-	-	-	-	-	-	215,0	0,073
-	-	-	-	-	-	-	242,0	0,090
-	-	-	-	-	-	-	265,0	0,114
-	-	-	-	-	-	-	289,0	0,136

