

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

**“EFEITO DA TEMPERATURA NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTIVOS EM
SUSPENSÃO DE CÉLULAS RECOMBINANTES DE *DROSOPHILA
MELANOGASTER S2*”**

Nickeli Rossi

São Carlos-SP

2008

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

**“EFEITO DA TEMPERATURA NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTIVOS EM
SUSPENSÃO DE CÉLULAS RECOMBINANTES DE *DROSOPHILA
MELANOGASTER S2*”**

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

Nickeli Rossi

Orientador:
Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo

São Carlos-SP
2008

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

R831et

Rossi, Nickeli.

Efeito da temperatura na otimização da produção de glicoproteína do vírus da raiva em cultivos em suspensão de células recombinantes de *Drosophila melanogaster* S2 / Nickeli Rossi. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
147 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Baixas temperaturas. 2. Biorreatores. 3. *Drosophila melanogaster*. 4. Glicoproteína da raiva. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

*Aos meus pais,
Deomir e Sirley.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por mais uma oportunidade em minha vida e por sua Providência no decorrer deste Mestrado.

Aos meus pais Deomir e Sirley e aos meus irmãos Monick e Julio César pelo apoio constante e por acreditarem em minha capacidade.

Ao professor Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo pela orientação deste trabalho, amizade e empenho em ensinar.

Ao meu namorado Gustavo pelo companheirismo, paciência e compreensão nos momentos de minha ausência.

Aos ex-alunos do LATECC: a Mabel pelo acolhimento na minha chegada em São Carlos e pelo bom tempo de convivência no laboratório, ao Douglas por me ensinar os primeiros passos num cultivo celular, a Kamilla pela amizade, atenção e ajuda no desenrolar do meu trabalho.

Ao Marcel e ao Professor Dr. Alberto pelos ensinamentos, paciência e dedicação em contribuir com o meu mestrado.

Aos alunos do LATECC: Camilo, Cristiane, Eduardo, e de maneira especial a Bruna, por não ter medido esforço em colaborar durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Álvaro e Amadeus por sempre estarem prontos a ajudar nos momentos de dificuldades. Aos amigos: Sheila, Eduardo, Elizabeth, Clóvis, Ediane, Laura, Léo e Gian.

As amigas de república: Cristhiane, Liliane, Lidiane e Sandra por seu carinho e atenção que suavizaram os momentos complicados.

Aos amigos do Grupo de Oração Universitário (GOU) Jesus Vive, da UFSCar, por sempre se fazerem presentes.

A minha amiga Vivian, pela amizade, companheirismo, por participar constantemente da minha vida e ter paciência em me ouvir nos momentos difíceis.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso desta difícil etapa de minha vida.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	iii
	LISTA DE TABELAS	vi
	LISTA DE SÍMBOLOS	ix
	LISTA DE ABREVIATURAS	x
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiii
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1	Produção da glicoproteína do vírus da raiva.....	6
3.2	Células de Inseto.....	11
3.3	Células de inseto: <i>Drosophila melanogaster</i>	16
3.4	Metabolismo de células de inseto.....	19
3.4.1	Metabolismo de carboidratos.....	20
3.4.2	Metabolismo de aminoácidos.....	22
3.4.3	Metabolismo do oxigênio.....	26
3.4.4	Acúmulo de subprodutos.....	27
3.5	Meios de cultura para células de inseto.....	29
3.6	Cultivo de células de inseto em biorreatores.....	31
3.7	Estratégias de cultivo para otimizar a produção de proteína recombinante..	43
3.8	Comentários sobre a revisão bibliográfica.....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	Materiais.....	50
4.1.1	Célula de inseto: preservação e condições de cultivo.....	50
4.1.2	Meio de cultura.....	50
4.2	Procedimento experimental a ser seguido num cultivo típico.....	51
4.2.1	Preservação das células.....	52
4.2.2	Descongelamento de células e ativação.....	52
4.2.3	Preparação de inóculo através do cultivo em frasco Schott.....	53
4.2.4	Estudos em pequena escala (frascos Schott).....	53
4.2.5	Cultivo em biorreator Bioflo 110.....	56
4.3	Métodos analíticos.....	60

4.3.1	Análise de densidade celular e viabilidade.....	60
4.3.2	Análise de morte celular.....	61
4.3.3	Análise de substratos e metabólitos.....	63
4.3.4	Análise de produto.....	63
4.4	Tratamento dos resultados.....	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	69
5.1	Estudos em pequena escala (frascos Schott).....	69
5.1.1	Otimização do meio de cultura para cultivo de células S2AcGPV2K.....	70
5.1.2	Cultivo em diferentes temperaturas para otimizar a produção de GPV.....	76
5.1.2.1	Cultivo em temperatura de 16°C.....	76
5.1.2.2	Cultivo em temperatura de 20°C.....	79
5.1.2.3	Cultivo em temperatura de 24°C.....	82
5.1.2.4	Cultivo em temperatura de 34°C.....	85
5.1.2.5	Comparação entre os experimentos realizados em frasco Schott em diferentes temperaturas de cultivo.....	88
5.2	Experimentos em biorreator Bioflo 110.....	90
5.2.1	Cultivo em temperatura de 28°C em biorreator.....	90
5.2.2	Cultivo em temperatura de 20°C em biorreator.....	94
5.2.3	Cultivo em três diferentes temperaturas, 20°C, 18°C e 16°C em biorreator..	98
5.2.4	Cultivo a temperatura de 20°C em biorreator em batelada-alimentada.....	102
5.2.5	Comparação entre os experimentos realizados em biorreator em diferentes temperaturas de cultivo.....	106
6	CONCLUSÕES.....	109
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	112
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
	APÊNDICE A: Valores experimentais referentes aos experimentos realizados.....	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1.	Esquema das principais vias metabólicas para a Sf9 (Adaptado de Öhman et al., 1995).....	21
FIGURA 3.2.	Metabolismo de aminoácidos proposto para células Sf9. Abreviações : GP6-glicose-6-fosfato ; F1,6P-frutose-bifosfato ; GAP- gliceraldeido fosfato ; HAP –dihidroxicetona fosfato ; PYR-piruvato ; 2-OG-2-oxiglutarato ; Enzimas : 1-DHAP desidrogenase ; 2-lactato desidrogenase ; 3.a-piruvato decarboxilase ; 3.b-etanol desidrogenase ; 4-glutamato-piruvato transaminase ; 5-glutamato sintase ; 6-glutamina sintetase ; 7-glutaminase ; 8-glutamina desidrogenase ; 9- fluxo do TCA de volta pra glicólise (Adaptado de Drews et al.,2000).....	24
FIGURA 3.3.	Exemplos de biorreatores utilizados no cultivo de células de inseto...	40
FIGURA 4.1.	Representação esquemática do procedimento de cultura padrão de células S2AcGPV2K.....	52
FIGURA 4.2.	Representação esquemática do procedimento seguido para a realização de experimentos de cultura com células S2AcGPV2K em incubador rotatório (shaker) a 100 rpm.....	53
FIGURA 4.3.	Biorreator Bioflo 110 utilizado nos cultivos de célula S2AcGPV2K (A) e seu sistema de oxigenação por membrana de silicone (B).....	57
FIGURA 4.4.	Representação esquemática do procedimento de cultura da célula S2AcGPV2K para a realização dos experimentos em biorreator Bioflo 110.....	57
FIGURA 4.5.	Esquema de procedimento a ser seguido após a retirada da amostra do biorreator Bioflo 110 em cada cultivo da célula S2AcGPV2K.....	59
FIGURA 5.1.	Resultados dos cultivos realizados com o meio Sf-900 II puro (controle) e suplementado com os aminoácidos prolina, serina, glutamina e cisteína para comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2, 28°C e 100 rpm.....	73
FIGURA 5.2.	Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 1,35 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L ⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L ⁻¹ de serina a 28°C e 16°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm.....	77

- FIGURA 5.3.** Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C e 20°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm..... 80
- FIGURA 5.4.** Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C e 24°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm..... 83
- FIGURA 5.5.** Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C e 34°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm..... 86
- FIGURA 5.6.** Comparação do crescimento e expressão de GPV em células S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em frasco Schott com meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina, a 100 rpm, utilizando diferentes temperaturas de cultivo como estratégia para aumentar a expressão de GPV..... 88
- FIGURA 5.7.** Efeito das diferentes temperaturas estudadas no crescimento (A) e na produção de GPV (B) da célula S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em frascos Schott com meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina, a 100 rpm..... 90
- FIGURA 5.8.** Crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K no experimento Bio-1 realizado em batelada em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C, OD=50%, agitação de 150 rpm, com controle de pH=6,2..... 92
- FIGURA 5.9.** Crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K no experimento Bio-2 realizado em batelada em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina a 20°C, OD=50%, agitação de 150 rpm, com controle de pH=6,2..... 95
- FIGURA 5.10.** Crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K no experimento Bio-3 realizado em batelada em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina, OD=50%, agitação de 150 rpm, com controle de pH=6,2 e temperatura em degraus, 20°C, 18°C e 16°C..... 100

- FIGURA 5.11.** Crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K no experimento Bio-4 realizado em batelada-alimentada com meio Sf-900 II suplementado com serina e cisteína na vazão de $F=3\text{mL.h}^{-1}$, volume inicial do biorreator de 850 mL. Meio inicial: Sf-900 II suplementado com $1,944\text{ g.L}^{-1}$ de prolina, $2,35\text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $0,0134\text{ g.L}^{-1}$ de cisteína, $0,132\text{ g.L}^{-1}$ de serina e $0,066\text{ g.L}^{-1}$ de asparagina a 20°C , $\text{OD}=50\%$, agitação de 150 rpm, com controle de $\text{pH}=6,2$ 104
- FIGURA 5.12.** Comparação do crescimento e expressão de GPV em células S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em biorreator com meio Sf-900 II suplementado com aminoácidos a 150 rpm, utilizando diferentes temperaturas de cultivo como estratégia para aumentar a expressão de GPV..... 106
- FIGURA 5.13.** Efeito das diferentes temperaturas estudadas no crescimento (A) e na produção de GPV (B) da célula S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em Biorreator com meio Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Para o cálculo do efeito de μ_{max} foi utilizado no experimento Bio 3 o valor de μ_{max} correspondente a temperatura de 18°C e para o Bio 4 foi utilizado μ_{max} depois da alimentação..... 108

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1.	Expressão da glicoproteína da raiva (GPV) em diferentes hospedeiros celulares.....	10
TABELA 3.2.	Sistemas de cultura de células de insetos para aplicações biotecnológicas diversas (adaptada de Agathos, 1991).....	12
TABELA 3.3.	Comparação de sistemas de expressão de proteínas recombinantes (adaptado de Cha et al., 2005).....	13
TABELA 3.4.	Comparação entre células de inseto e de mamíferos em cultura utilizando propriedades importantes para desenvolvimento de bioprocessos (Adaptado de Goosen, 1993).....	15
TABELA 3.5.	Proteínas expressas por células de <i>Drosophila melanogaster</i> (Adaptado de Invitrogen, 2003).....	18
TABELA 3.6.	Meios suplementados com SFB para cultura de células de inseto (Adaptado de Silva, 2006).....	30
TABELA 3.7.	Meios livres de soro (MLS) comercialmente disponíveis para cultura de células de inseto (Adaptado de Silva, 2006).....	31
TABELA 3.8.	Estratégias de alimentação para a produção de proteínas recombinantes em células de inseto (adaptado de Ikonomou et al., 2003).....	34
TABELA 3.9.	Cultivo de células de inseto em cultura em suspensão: uma comparação das técnicas de cultura (adaptada de Goosen, 1993).....	37
TABELA 3.10.	Características de crescimento de várias linhagens de células de inseto em biorreatores (adaptado de Schmid, 1996).....	39
TABELA 3.11.	Efeito da temperatura sub-fisiológica (<37°C) no cultivo de células de mamíferos na produção de proteínas recombinantes (adaptado de Al-Fageeh et al., 2006).....	48
TABELA 4.1.	Composição do meio de cultura Sf900 II utilizado para o cultivo de células de <i>Drosophila melanogaster</i> S2.....	51
TABELA 4.2.	Experimentos realizados em pequena escala, em frasco Schott, para avaliar a expressão de GPV da célula S2AcGPV2K.....	55
TABELA 4.3.	Experimentos realizados em biorreator Bioflo 110 para avaliar a expressão de GPV da célula S2AcGPV2K.....	58

TABELA 5.1.	Crescimento da célula S2AcGPV2K com e sem a adição de 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 1,350 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L ⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L ⁻¹ de serina ao meio de cultura Sf-900 II. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, incubados em shaker a 28°C e 100 rpm...	72
TABELA 5.2.	Comparação da expressão de GPV da célula S2AcGPV2K em experimentos com e sem a adição de aminoácidos no meio de cultura Sf-900 II, realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, incubados em shaker a 28°C e 100 rpm.....	74
TABELA 5.3.	Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 16°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 1,350 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L ⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L ⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.....	78
TABELA 5.4.	Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 20°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 1,350 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L ⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L ⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.....	79
TABELA 5.5.	Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 24°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 1,350 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L ⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L ⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.....	84
TABELA 5.6.	Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 34°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 1,350 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L ⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L ⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schotts de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.....	87
TABELA 5.7.	Comparação entre os parâmetros cinéticos determinados nos cultivos com células S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 1,350 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L ⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L ⁻¹ de serina, em diferentes temperaturas de cultivo, em frascos Schott de 250 mL com volume de trabalho de 30 mL, pH 6,2 e agitação de 100 rpm para aumento da produção de GPV.....	89

TABELA 5.8.	Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 20°C (Bio 2) e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 2,35 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L ⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L ⁻¹ de serina e 0,066 g.L ⁻¹ de asparagina. Os experimentos foram realizados em batelada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.....	96
TABELA 5.9.	Parâmetros cinéticos de crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 20°C, 18°C e 16°C (Bio 3) comparados com o cultivo controle (28°C) em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 2,35 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L ⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L ⁻¹ de serina e 0,066 g.L ⁻¹ de asparagina. O experimento foi realizados em batelada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.....	101
TABELA 5.10.	Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 20°C (Bio 4) em batelada-alimentada e 28°C (controle) em batelada, em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ de prolina, 2,35 g.L ⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L ⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L ⁻¹ de serina e 0,066 g.L ⁻¹ de asparagina. Os experimentos foram realizados em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.....	105
TABELA 5.11.	Comparação entre os parâmetros cinéticos determinados nos cultivos com células S2AcGPV2K em diferentes temperaturas de cultivo, em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50%, agitação de 150 rpm e meio Sf-900 II suplementado com aminoácidos para aumento da produção de GPV.....	107

LISTA DE SÍMBOLOS

Abreviatura	Nome	Unidade
X_{\max}	Densidade de células máxima	cel.mL ⁻¹ ;
C_{\max}^{GPV}	Concentração máxima de GPV	ngGPV.mL ⁻¹
X_{LDH}	Densidade de células mortas determinada por LDH	cel.mL ⁻¹
T	Temperatura	°C
k_D	Constante de morte celular	h ⁻¹
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de O ₂	h ⁻¹
μ	Velocidade específica de crescimento celular	h ⁻¹
μ_{\max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular	h ⁻¹
OD	Oxigênio Dissolvido	mmol.L ⁻¹
P_{\max}	Produtividade máxima	cel.mL ⁻¹ .h ⁻¹ ; ngGPV.mL ⁻¹ .h ⁻¹
$q_{\text{Substrato}}$	Velocidade de consumo de substratos	gSubstrato.cel ⁻¹ .h ⁻¹
q_{GPV}	Velocidade de formação de GPV	ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹
t	Tempo	horas, dias
t_{lag}	Tempo de duração da fase lag	horas
V_t	Volume de trabalho	mL
X	Densidade celular	cel.mL ⁻¹
$Y_{\text{GPV}/\text{Cel}}$	Rendimento de GPV em função do número de células	ng.10 ⁻⁶ cel
Y_{XSubs}	Rendimento celular em função do consumo de substrato	10 ⁶ cel.gSubstrato ⁻¹
n_v	Número total de células viáveis	cel.mL ⁻¹
n_d	Número total de células inviáveis	cel.mL ⁻¹
V_c	Volume de um quadrante da câmara de Neubauer	mL
\bar{D}	Taxa de diluição média do cultivo em batelada alimentada	h ⁻¹
F	Vazão de alimentação	mL.h ⁻¹
\bar{V}	Volume médio do cultivo em batelada alimentada	mL
Sp	Concentrações de subprodutos	g.L ⁻¹
S	Concentrações de substratos	g.L ⁻¹

LISTA DE ABREVIATURAS

S2	Células <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider linhagem 2
S2AcGPV2K	Células S2 modificadas geneticamente para produção de GPV
Ser	Serina
Sf9	Células <i>Spodoptera frugiperda</i> linhagem 9
Sf21	Células <i>Spodoptera frugiperda</i> linhagem 21
SFB	Soro fetal bovino
Thr	Treonina
<i>T.ni</i>	Células <i>Trichoplusia ni</i>
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
aa	Aminoácidos
Abs	Valor da absorbância medida da amostra
ADN	Ácido desoxirribonucléico
PBS	Phosphate buffered saline
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
BHK	Células “baby hamster kidney”
BM-5	Células <i>Bombyx mori</i>
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetilsulfóxido
LDH	Enzima lactato desidrogenase
FD	Fator de diluição para célula de inseto
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
MRC-5	Células de pulmão de feto humano
M.O.I.	Multiplicity of infection
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina

tPA	Tissue plasminogen activator
Tyr	Tirosina
Val	Valina
WI-38	Células de pulmão de feto humano

RESUMO

O aumento da expressão de proteínas recombinantes complexas corretamente processadas como as produzidas por células animais é essencial para o desenvolvimento de um bioprocesso eficiente em larga escala. A manipulação das condições de cultivo desempenha um papel muito importante na expressão otimizada e controlada dessas proteínas em biorreatores. A resposta de células de mamíferos e de insetos quando submetidas ao efeito da temperatura vem sendo estudada por vários pesquisadores como estratégia potencial para o aumento de expressão de proteínas recombinantes. No presente trabalho propõe-se avaliar a influência da temperatura no cultivo celular com o propósito de intensificar a produção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) em cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2 recombinante em meio de cultura Sf900-II suplementado com aminoácidos, em frascos Schott (em shaker) e em biorreator de tanque agitado livre de bolhas. Para tal, foram avaliadas cinco temperaturas de cultivo em frasco Schott: 16, 20, 24, 28 e 34°C. Os resultados obtidos de velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max}) nesses cultivos foram, respectivamente: 0,009, 0,020, 0,039, 0,036 e 0,022 h⁻¹, e de concentração máxima de GPV (C^{GPV}_{\max}): 0,075, 2,973, 0,480, 1,404 e 0,013 mg.mL⁻¹. A melhor temperatura para produção de GPV (20°C) foi escolhida para ser testada em biorreator operado em batelada e batelada alimentada, mantendo 28°C como controle. Os resultados de μ_{\max} e C^{GPV}_{\max} em batelada foram: 0,061 h⁻¹ e 0,149 mg.mL⁻¹ a 28°C e 0,027 h⁻¹ e 0,354 mg.mL⁻¹ a 20°C. Um experimento em batelada com temperatura decrescente em etapas de 20°C a 16°C apresentou um μ_{\max} variando de 0,024 a 0,012 h⁻¹ e uma C^{GPV}_{\max} final de 0,567 mg.mL⁻¹. Por outro lado, a 20°C em batelada alimentada, μ_{\max} foi de 0,024 h⁻¹ e C^{GPV}_{\max} de 1,155 mg.mL⁻¹. A maior produção de GPV observada em frascos Schott pode ser consequência de uma condição mais favorável para expressão da proteína em condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido como as usuais em frascos Schott mas não em cultivos em biorreator com oxigênio dissolvido controlado a 50%. Em geral, estes resultados mostram uma maior expressão da proteína recombinante nas temperaturas mais baixas, especialmente quando μ_{\max} é mantido razoavelmente baixa. A maior produção de GPV foi obtida no cultivo realizado a 20°C em frasco Schott quando $C^{\text{GPV}}_{\max}=2,973$ mg.mL⁻¹ em comparação a 1,404 mg.mL⁻¹ obtida no cultivo controle a 28°C. Assim, a utilização de temperaturas de cultivo mais baixas, próximas de 20°C, pode ser considerada a melhor estratégia na otimização da produção de GPV.

Palavras-Chave: Baixa temperatura, biorreator, células de inseto, *Drosophila melanogaster* S2, glicoproteína do vírus da raiva, produção de proteína recombinante.

ABSTRACT

The increment of the expression of complex correctly processed recombinant proteins, like the ones produced by animal cells, is essential for the development of an efficient large scale bioprocess. The manipulation of culture conditions plays a very important role in the controlled and optimized expression of these proteins in bioreactors. The response of mammalian and insect cells to temperature effect has been studied by several researchers as a potential strategy to enhance production of recombinant proteins. The present study evaluated the influence of the temperature in the culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells in Sf-900 II medium supplemented with aminoacids with the aim of enhancing the production of the rabies virus glycoprotein (RVGP). The cultures were carried out in Schott flasks (in shaker) as well as in a bubble-free stirred tank bioreactor. Five temperatures were tested in Schott flasks cultures: 16, 20, 24, 28 and 34°C. The results obtained in cultures at those temperatures in terms of maximum specific growth rate (μ_{\max}) and maximum RVGP concentration (C_{\max}^{GPV}) were, respectively: 0.009, 0.020, 0.039, 0.036 and 0.022 h⁻¹, and 0.075, 2.973, 0.480, 1.404 and 0.013 mg.mL⁻¹. The best temperature for RVGP production (20°C) was chosen to be evaluated in the bioreactor operated in batch and feed-batch mode, keeping 28°C as control. The results of μ_{\max} and C_{\max}^{GPV} in batch mode were: 0,061 h⁻¹ and 0,149 mg.mL⁻¹ at 28°C and 0,027 h⁻¹ and 0.354 mg.mL⁻¹ at 20°C. A batch experiment with stepwise temperature decrease from 20°C to 16°C presented a μ_{\max} ranging from 0.024 to 0.012 h⁻¹ and a final C_{\max}^{GPV} of 0.567 mg.mL⁻¹. On the other hand, at 20°C in feed-batch mode, μ_{\max} was 0.024 h⁻¹ and C_{\max}^{GPV} 1.155 mg.mL⁻¹. The larger production of RVGP observed in Schott flasks can be a consequence of a more favorable condition for the expression of the protein at low values of dissolved oxygen concentrations that are seen in flasks but not in controlled bioreactor cultures at 50% DO. Overall, these results show an increase of recombinant protein expression at lower temperatures, especially when μ_{\max} is kept fairly low. The largest production of RVGP was obtained in the culture at 20°C in Schott flask when C_{\max}^{GPV} was 2.973 mg.mL⁻¹, while the production obtained at the control temperature of 28°C was only of 1.404 mg.mL⁻¹. Thus, the use of reduced culture temperatures, around 20°C, seems to be the best strategy for the optimization of RVGP production.

Keywords: Bioreactor, *Drosophila melanogaster* S2, insect Cells, low temperature, rabies virus glycoprotein, recombinant protein production.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de células animais tem um amplo impacto comercial e significado social, desempenhando um papel importante na biotecnologia moderna, especialmente no que se refere à produção de enzimas, hormônios, anticorpos e proteínas. Esses produtos são amplamente utilizados nas áreas biomédicas, de alimentos, agropecuária, farmacológica, e em indústrias de vacinas.

A produção de vacinas humanas e veterinárias mediante a utilização de células de mamíferos tem sido feita com sucesso desde 1954 e encontra atualmente na utilização de células de inseto uma perspectiva bastante atrativa em função das vantagens que estas células oferecem. Atualmente, todas as vacinas contra a raiva são baseadas em vírus inativados propagados em diferentes substratos (cérebro de camundongos, embriões de pato e cultura de células diplóides humanas, células Vero e células de embrião de galinha). Embora o processo de fabricação da vacina anti-rábica venha evoluindo ao longo dos anos (SAKAMOTO et al., 1999), vacinas inativadas originárias de tecidos nervosos podem estar associadas a sérios efeitos colaterais neurológicos. Por esta razão, é desejável o desenvolvimento de vacinas eficientes que eliminem a possibilidade de tais efeitos colaterais e que possam ser produzidas sem a utilização de materiais de risco e com baixo custo. Uma das mais populares e promissoras alternativas para o desenvolvimento de novas vacinas anti-rábicas é a utilização de genes do vírus da raiva clonados e expressos em cultura de células animais. Essa possibilidade é baseada no fato de que apenas uma simples proteína viral, a glicoproteína G (proteína de membrana, presente na superfície do vírus) ou GPV, seja suficiente para produzir resposta imune (SAKAMOTO et al., 1999).

O desenvolvimento de sistemas de expressão mais eficazes para a produção de proteínas recombinantes em altos níveis tem sido considerado como prioridade para muitos

pesquisadores nos dias atuais. A reprodução autêntica de proteínas de organismos superiores freqüentemente requer a utilização de células hospedeiras eucarióticas para garantir a completa atividade biológica.

Além da alta capacidade de expressão, células de inseto são relativamente mais baratas de se manter, em comparação com células de mamíferos. Seus cultivos podem ser aumentados de escala com relativa facilidade e estas células também são capazes de realizar a maioria das reações cotraducionais e postraducionais que ocorrem em outras células eucarióticas. Nos últimos anos, os sistemas de expressão utilizando células de *Drosophila* têm sido muito satisfatórios para a obtenção de altos níveis de uma série de proteínas recombinantes, devido à utilização de promotores eficientes e a habilidade da célula de gerar um grande número de cópias do plasmídeo introduzido (McCARROLL E KING, 1997).

O aumento da expressão de proteína recombinante de linhagens celulares transfectadas é essencial para o desenvolvimento eficiente de um bioprocessamento em larga escala. Estudo das condições de cultivo que afetam a qualidade do produto são importantes para uma próspera operação e otimização de biorreatores. Recentes trabalhos (YOKOMIZO et al., 2007 e SWIECH et al., 2007) mostraram as potencialidades interessantes das células de *Drosophila melanogaster* em cultivo para produção de uma proteína de membrana como a GPV, porém, em função de níveis de expressão que ainda podem ser considerados baixos para esse tipo de proteína, a identificação de condições de cultivo mais favoráveis para sua expressão torna-se uma etapa estritamente necessária para o desenvolvimento de um processo de cultivo de alta produtividade. Algumas técnicas utilizadas em células de mamíferos com esse objetivo têm conseguido aumentos significativos de proteína recombinante, entre as quais podem-se destacar: a) cultivo das células em baixas temperaturas e b) adição de agentes que promovem o aumento da expressão da proteína de interesse como DMSO (dimetilsulfóxido), butirato de

sódio, rapamicina, AMP (adenosina monofosfato) e glicerol (AL-FAGEEH et al., 2006; LI et al., 2006).

Muitos organismos vivos têm adaptado sofisticadas estratégias para permitir sua sobrevivência através de uma faixa dinâmica de temperaturas (FUJITA, 1999). Estudos revelaram que baixas temperaturas de cultivo possuem alguns efeitos benéficos, apesar de diminuir a velocidade específica de crescimento (μ). Dentre as vantagens de cultivos em baixas temperaturas podem-se destacar: manutenção de alta viabilidade celular por um longo período de tempo (FURUKAWA E OHSUYE, 1998) e aumento da produtividade específica (FURUKAWA E OHSUYE, 1999; HENDRICK et al., 2001), sendo esta uma técnica simples, barata e que gera bons resultados.

A resposta de células eucarióticas ao efeito da temperatura e os mecanismos biológicos que governam a resposta celular em temperaturas sub-fisiológicas ainda não são bem entendidos. O choque térmico expõe as células a dois principais estresses, aqueles relacionados às mudanças da temperatura do meio de cultivo e os relacionados às mudanças nas concentrações de oxigênio dissolvido em temperaturas reduzidas (OHSAKA et al., 2002). Uma vez que é escasso na literatura estudos de estratégias de cultivo para aumento de produção de proteínas recombinantes em células de inseto, torna-se importante o estudo de estratégias de cultivo que possibilitem a intensificação da produção e a diminuição da degradação e alteração conformacional da GPV.

Neste trabalho foi avaliada a influência de baixos valores de temperatura na produção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) em cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2 recombinante (S2AcGPV2K) em incubadora agitada (shaker) e em biorreator.

Considerando a importância de estudos visando à produção da GPV, o presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto temático FAPESP (02/09482-3) relacionado à Biologia Molecular e Engenharia de Bioprocessos para a Produção de Proteínas

Recombinantes com Células de Inseto, e contou com a colaboração do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT, Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP e Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivo identificar valores de temperatura em combinação com estratégias de cultivo apropriadas de células de *Drosophila melanogaster* S2 recombinante (S2AcGPV2K) que conduzam a uma expressão da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) com altas produtividades e de forma estável em um biorreator de tanque agitado em escala laboratorial de 1 L.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção da glicoproteína do vírus da raiva

A raiva é uma doença que acomete a mamíferos e que pode ser transmitida aos homens sendo, portanto, uma zoonose. O vírus da raiva causa uma forma fatal de encefalomielite, que freqüentemente produz vítimas tanto em seres humanos como em animais domésticos e selvagens. De acordo com estudos realizados em 2004, a OMS, Organização Mundial da Saúde, estimou que o número de mortes humanas a nível mundial chega a 55.000 casos, sendo a maioria deles em regiões rurais da África e Ásia.

Diversos países continuam a produzir vacinas virais derivadas de tecido cerebral animal, que além de serem menos potentes, podem produzir sérios efeitos colaterais incluindo encefalomielites alérgicas. As vacinas da raiva humana são usadas normalmente como um agente terapêutico pós-exposição em pessoas mordidas por animal raivoso, mas países em desenvolvimento não são auto-suficientes na produção de vacinas contra a raiva. Além disso, o processo da produção da vacina da raiva inclui passos perigosos devido à manipulação de grandes quantidades de materiais infecciosos (COSTA et al., 2000). As vacinas modernas baseadas em cultura de células, apesar de serem mais seguras e efetivas, apresentam um custo elevado quando comparada às vacinas derivadas de tecidos animais.

Pasteur desenvolveu a primeira vacina anti-rábica em 1885. A partir disto, a produção desta vacina acompanhou o desenvolvimento tecnológico, principalmente em relação à imunogenicidade e segurança (PÉREZ E PAOLAZZI, 1997). Abaixo estão exemplificadas as principais vacinas anti-rábicas de uso humano (VIEIRA, 2007).

- **Vacina produzida em cérebro de camundongos do tipo Fuenzalida & Palácios modificada:** A vacina anti-rábica utilizada de rotina no Brasil é a vacina Fuenzalida & Palácios modificada. É produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos, inoculados

com a cepa Pasteur de vírus fixo. Posteriormente os vírus são inativados pela betapropiolactona, de acordo com a técnica de Fuenzalida & Palácios. Tem alto poder antigênico e baixa concentração de células nervosas (cerca de 2%), ficando assim bastante reduzidas as reações neurológicas pós-vacinais (VIEIRA, 2007).

- **Vacina produzida em cultura de células diplóides humanas (*human diploid cell vaccine* – HDCV):** Desde a década de 1950, são pesquisados outros substratos para a replicação viral, visando à redução dos eventos adversos, principalmente os neurológicos. Na década de 1960, o Wistar Institute, na Filadélfia, Estados Unidos, desenvolveu a primeira vacina em cultura de células diplóides humanas, liberada para uso em 1976. A vacina é produzida com a cepa Pitman-Moore e os vírus são inativados pela betapropiolactona. A potência mínima requerida, 2,5 UI por dose, é maior que a da Fuenzalida & Palácios modificada (1,0 UI por dose), devido à maior concentração viral, obtida por ultracentrifugação (VIEIRA, 2007).

- **Vacina purificada produzida em cultura de células Vero (*purified Vero cell vaccine* – PVCV):** Substrato desenvolvido a partir do rim de macacos verdes Africanos, inicialmente utilizado para a produção de vacinas contra a poliomielite. A vacina é semelhante à HDCV; é produzida com a cepa Pitman-Moore, inativada por betapropiolactona e concentrada por ultracentrifugação. A potência mínima requerida também é 2,5 UI por dose. A resposta a esta vacina e as incidências de reações adversas são semelhantes às da HDCV (VIEIRA, 2007).

- **Vacina purificada produzida em cultura de células de embrião de galinha (*purified chick-embryo cell vaccine* - PCEV):** É preparada com a cepa Flury LEP-C25 e desenvolvida em fibroblastos de embrião de galinha. A eficácia e a segurança são semelhantes às da HDCV. Os vírus são concentrados por ultracentrifugação, inativados por

betapropiolactona e a potência mínima requerida é 2,5 UI por dose. A vacina contém albumina humana e traços de neomicina, clortetraciclina e anfotericina B (VIEIRA, 2007).

- **Vacina purificada produzida em embrião de pato (*purified duck-embryo vaccine* – PDEV):** É produzida com a cepa Pitman-Moore, inativada pela betapropiolactona e concentrada por ultracentrifugação. O vírus é cultivado em ovos embrionados e não em cultura celular. É produzida na Suíça; a potência mínima requerida é 2,5 UI por dose; causa maior incidência de eventos adversos, embora moderados, quando comparada com a HDCV (VIEIRA, 2007).

No Brasil, o Instituto Butantan descontinuou a produção da vacina contra raiva em camundongos lactantes (Fuenzalida) e está começando a produzir uma vacina em células Vero, em meio livre de soro fetal bovino. Isto deverá reduzir o risco de transmissão de zoonoses e prions. O Instituto de Tecnologia do Paraná, maior produtor nacional de vacina anti-rábica de uso veterinário, com produção anual de mais de 30 milhões de doses distribuídas pelo Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, do Ministério da Saúde, começou a produzir vacina anti-rábica com base em cultivo celular para uso humano (Vero) e animal (BHK), cumprindo a meta de melhoria do padrão tecnológico da produção de vacinas (SWIECH, 2007).

Embora o processo de fabricação da vacina anti-rábica venha evoluindo ao longo dos anos, vacinas inativadas originárias de tecidos nervosos podem estar associadas a sérios efeitos colaterais neurológicos. Levando em consideração os problemas relacionados a esses efeitos, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de desenvolver vacinas baseadas em sistemas de produção mais seguros e efetivos e de baixo custo (SAKAMOTO et al., 1999). Neste cenário, o desenvolvimento de uma vacina baseada em proteínas recombinantes e não na partícula viral em cultura de células, surge como uma atrativa alternativa para o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas. Essa possibilidade é baseada no fato de

que apenas uma simples proteína viral, a glicoproteína G (proteína de membrana, presente na superfície do vírus), seja suficiente para produzir resposta imune (SAKAMOTO et al., 1999).

Além da necessidade de uma vacina anti-rábica mais segura, há também a necessidade de se produzir quantidades suficientes da proteína para a realização de sua caracterização biológica (estrutura, função, estabilidade, antigenicidade e imunogenicidade). A caracterização da GPV realizada nos trabalhos disponíveis na literatura atual é, na maioria das vezes, prejudicada em função das alterações conformacionais que a proteína sofre em baixos valores de pH (IRIE, KANAKANAMAGE e KAWAI, 2006) e inadequada maturação (SAKAI et al., 2004). O aumento da disponibilidade de sistemas de expressão de glicoproteínas bem como sua produção em grandes quantidades, deverão propiciar um melhor entendimento das relações estrutura-função entre as glicofomas possíveis, o que poderá levar ao desenvolvimento de novos produtos terapêuticos (SETHURAMAN E STADHEIM, 2006).

Vários sistemas têm sido estudados para expressão da glicoproteína do vírus da raiva, tais como bactérias e células eucariontes. Dentre estes, a produção da glicoproteína em células eucariontes tem se demonstrado eficiente imunogenicamente e antigenicamente (GUPTA et al, 2005).

A Tabela 3.1 apresenta os principais trabalhos encontrados na literatura que relatam a expressão da glicoproteína do vírus da raiva. Apesar deste antígeno ser expresso em diferentes sistemas de cultivo atualmente, além de poucos dados satisfatórios sobre os níveis e as características da proteína expressa terem sido encontrados, ainda não há relato de um sistema de expressão satisfatório visando à escolha de um processo eficiente e econômico para a produção da GPV.

Yokomizo et al. (2007) expressaram a GPV em células S2 e concluíram que: a proteína expressa neste sistema apresentou um peso molecular de 65 kDa, semelhante à glicoproteína extraída do vírus rábico; 20-30% da população total de células expressaram a

GPV na membrana celular; a GPV recombinante foi capaz de induzir proteção contra desafio com vírus rábico CVS (*Challenge Virus Standard*) apresentando uma sobrevivência de até 80%.

Tabela 3.1. Expressão da glicoproteína da raiva (GPV) em diferentes hospedeiros celulares.

Sistema de Expressão	Célula/Planta	Produção de GPV	Principais Conclusões	Referência
Planta	<i>Nicotiana tabaccum</i>	0,001-0,38% do total protéico das folhas	100% de sobrevivência após desafio com o vírus da raiva.	Ashraf et al., 2005
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	BHK-21	n.d.	Mudança conformacional da GPV em função do pH, alterando o reconhecimento pelo anticorpo	Kankanamage et al., 2003
Leveduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30-40 ng.mL ⁻¹	GPV não foi corretamente produzida	Sakamoto et al., 1999
Cel. Mamíferos (Infecção vírus)	BHK-21	n.d.	Expressão apenas do ectodomínio da GPV leva a mudanças conformacionais e formação de monômeros.	Maillard e Gaudin, 2002
Cel. Mamíferos (Transfecção estável em conjunto com GFP)	BHK-21	10-50% de células fluorescentes	Adição de butirato de sódio e propionato de sódio auxiliam na correta maturação da proteína e aumentam a expressão	Sakai et al., 2004
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	CHO-K1	n.d.	Expressão satisfatória de GPV secretada com adequada imunogenicidade	Wojszyk et al., 1998
Cel. Inseto Baculovírus	Sf9	n.d.	GPV pode ser produzida em preparações livres de células com alta imunogenicidade	Drings, 1999
Cel. Inseto	S2	300µg.L ⁻¹	GPV pode ser expressa em células S2 com correta atividade biológica	Yokomizo et al., 2007
Cel. Inseto	S2	136,4 µg.L ⁻¹	Estratégias utilizadas para controlar o crescimento celular propiciaram aumento na produção de GPV	Swiech, 2007

n.d. – não definido

A glicoproteína da raiva foi expressa também, em células S2, por Swiech (2007), onde através de estratégias para controlar o crescimento celular obteve-se uma maior produção de proteína recombinante, com concentração de 136,4 ng.mL⁻¹.

3.2 Células de Inseto

Sistemas de inclusão de um fragmento de ácido nucléico em um vetor com o objetivo de expressar proteínas surgiram na década de 70 e vêm-se desenvolvendo rapidamente. Esta metodologia vem sendo utilizada com várias aplicações, como a produção de vacinas, a produção de proteínas em larga escala, o estudo do metabolismo celular, o estudo da expressão gênica quanto aos aspectos de transcrição e tradução de proteínas, a replicação de DNA e ainda os mecanismos envolvidos na mutagênese e reparo de DNA.

As primeiras tentativas de culturas de células de inseto ocorreram por volta de 1915, sendo que até 1959 ainda não existia uma linhagem de células permanentes, apenas observava-se o crescimento e prolongamento de tecidos (GRACE, 1959).

A Tabela 3.2 apresenta algumas das diversas aplicações do cultivo de células de insetos. Dentre as linhagens citadas, destaca-se a *Spodoptera frugiperda* Sf9, derivadas do ovário de pupa de borboleta e utilizada para a obtenção de biopesticidas e proteínas recombinantes, além da linhagem High Five obtida de células ovo da *Trichopusia ni* empregada largamente também na produção de proteínas recombinantes.

A seleção de um sistema de expressão de proteínas recombinantes adequado é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um bioprocessos, sendo que um bom sistema de expressão pode levar a uma boa funcionalidade do produto, altos rendimentos de produção e purificação com baixos custos. No entanto, esta seleção está freqüentemente baseada em fatores complexos, como por exemplo: propósito de utilização da proteína recombinante (farmacêutico, enzima industrial, alimentação humana ou animal); a funcionalidade da proteína expressa; propriedades físico-químicas da proteína; níveis de expressão requeridos; modificações pós traducionais desejadas (glicosilação, formações de ligações dissulfeto, entre outras); secreção; envelhecimento, velocidade de crescimento da célula, rendimento celular e

assim por diante (CHA et al., 2005). Portanto, a escolha de um sistema de expressão adequado deve ser realizada levando em consideração as vantagens e desvantagens de cada célula, como pode ser visto na Tabela 3.3.

Tabela 3.2. Sistemas de cultura de células de insetos para aplicações biotecnológicas diversas (adaptada de AGATHOS, 1991).

Tipo de Célula	Tipos de Produtos Obtidos
Células de Lepidópteros	
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Proteínas recombinantes, bioinseticida
<i>Trichoplusia ni</i>	Enzimas, fatores de crescimento, antígenos virais dentre outros.
<i>Bombyx mori</i>	Bioinseticida
<i>Autographa californica</i>	Bioinseticida
<i>Heliothis zea</i>	Bioinseticida
<i>Lymantris dispar</i>	Bioinseticida
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	Bioinseticida
<i>Neodiprion sertifer</i>	Bioinseticida
Células de Dípteros	
<i>Aedes aegypti</i>	Compostos para diagnósticos, vacinas
<i>Drosophila melanogaster</i>	Proteínas recombinantes
<i>Sarcophage peregrina</i>	Inibidor de crescimento celular

Células de inseto são fáceis de manipular e podem crescer em altas densidades em culturas em spinners ou biorreator (McCARROLL E KING, 1997). Dois tipos de métodos de cultivo dominam a prática industrial: cultura em suspensão, na qual as células são livremente suspensas em um caldo nutritivo, e cultura em microcarregadores na qual as células dependentes de ancoramento crescem na superfície de carregadores sólidos suspensos em uma

cultura líquida. Independente do método de cultura, o fluido suspenso é invariavelmente aspergido diretamente com ar ou outra mistura de gás, suprindo as células com oxigênio (BIRCH et al., 1987).

Tabela 3.3. Comparação de sistemas de expressão de proteínas recombinantes (adaptado de CHA et al., 2005).

	<i>E. coli</i>	Levedura	Inseto	Mamífero
Crescimento	Muito rápido	Rápido	Moderado	Lento
Rendimento da expressão (massa seca)	Alto (1-5%)	Alto (>1%)	Muito alto (30%)	Muito baixo (<1%)
Produtividade	Muito alta	Alta	Alta	Baixa
Custo do meio de cultura	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Técnica de cultura	Muito fácil	Fácil	Difícil	Muito difícil
Custo de produção	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Enovelamento da proteína	Razoável	Bom	Muito bom	Muito bom
Glicosilação simples	Não	Sim	Sim	Sim
Glicosilações complexas	Não	Não	Sim *	Sim
Secreção	Ruim	Muito boa	Muito boa	Muito boa
Funcionalidade da proteína expressa	Ruim	Boa	Muito boa	Muito boa
Sistemas gênicos disponíveis	Muito bons	Bons	Razoáveis	Razoáveis
Formação de pirogênios	Possível	Não	Não	Não
Sensibilidade ao cisalhamento	Baixa	Baixa	Alta	Moderada

* Perfis de glicosilação diferentes das células de mamíferos. Células de inseto não possuem a capacidade de expressar determinados oligossacarídes complexos e adicionar ácido siálico (IVEY-HOYLE, 1991).

As células de inseto são capazes de promover vários tipos de modificações pós-traducionais. 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. Porém em glicosilações complexas, os perfis de glicosilação das células de inseto diferem das células de mamíferos, pois as células de inseto não possuem a capacidade de expressar determinados oligossacarídes complexos e adicionar ácido siálico (IVEY-HOYLE, 1991).

Células de inseto em conjunto com o sistema vetor de expressão baculovirus (SVEB) têm sido alvo de inúmeros estudos tanto na produção de bioinseticidas quanto na produção de proteínas recombinantes de interesse industrial, sendo o sistema de expressão mais utilizado para produção de proteínas em células de inseto, principalmente devido aos altos níveis de

expressão atingidos (MILLER, 1993). O gene de interesse é inserido no genoma do baculovírus sob o controle de promotores de transcrição virais e o vírus recombinante é utilizado para infectar células de lepidópteros (SUMMERS E SMITH, 1987). O vírus contém uma série de promotores muito ativos, portanto o rendimento das proteínas expressa pode ser muito alto, cerca de 20 – 250 vezes maior do que em células de mamíferos (VAUGHN et al., 1999).

No entanto, Sanderson et al. (1999) listam algumas dificuldades com o SVEB como a produção de proteases, não secreção de produto, lise da célula e incompleta glicosilação. Lu et al. (1997) também apontaram algumas limitações desse tipo de expressão, como: redução das modificações pós-traducionais adequadas durante a fase de alta produção (estágios tardios da infecção) devido aos danos ao maquinário de modificação de proteínas; impossibilidade de células de inseto infectadas por baculovírus de processarem, durante a fase tardia de infecção, complexos de transcrição contendo íntrons (regiões não codificadoras de um gene) e produzirem proteínas recombinantes a partir de uma seqüência de genes; dificuldades associadas com a purificação da proteína recombinante devido à lise celular no final do processo de infecção e liberação de proteases que causam degradação dos produtos expressados. Nenhum destes problemas acontece em sistemas de expressão em células de inseto em que a célula se mantém intacta (sem infecção) durante a fase de produção.

Linhagens de células de inseto transfectadas de maneira estável têm ganhado importância como sistemas de expressão alternativos de proteínas complexas devido ao grande número de vantagens quando comparada a células de mamíferos. Estas vantagens incluem menor temperatura de crescimento, condições de cultivo menos complexas, culturas contínuas, adaptabilidade a biorreatores de larga escala, habilidade de processamento pós-traducional (PFEIFER, 1998). Outras vantagens das células de inseto perante células de mamíferos podem ser observadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Comparação entre células de inseto e de mamíferos em cultura utilizando propriedades importantes para desenvolvimento de bioprocessos (Adaptado de GOOSEN et al., 1993).

Propriedades	Inseto	Mamíferos
Crescimento em meio livre de soro	Fácil	Difícil
Crescimento até altas densidades	Fácil	Difícil
Dependência de componentes protéicos no meio	Não	Sim
Dependência de CO ₂	Não	Sim
Manutenção das células	Fácil	Difícil
Imortalidade da célula	Sim	Seletiva*
Versatilidade suspensão/aderida	Sim	Não
Inibição por contato	Mínima ou ausente	Presente**
Utilização de enzimas dissociativas de tecidos	Não necessária	Necessária
Expressão de proteínas recombinantes	Alta	Baixa
Temperatura de incubação	28°C	37°C
Susceptibilidade a mudanças de pH, OD, pressão osmótica	Baixa	Alta
Aprovação do FDA para biofármacos provenientes de substratos celulares	Não***	Sim
Potencial para patogencidade de vetores virais em humanos	Não	Sim

* apenas em linhagens transformadas; ** linfóides são exceção; *** em fase de testes clínicos.

Cox (2004) cita que nenhuma proteína produzida através do cultivo de células de inseto foi aprovada para uso terapêutico humano, mas esta tecnologia apresenta um significativo potencial, visto que um grande número de produtos está em processo avançado de aprovação. Por exemplo, a companhia Dendreon Corporation está na fase III dos estudos clínicos para uma vacina contra câncer de próstata. GlaxoSmithKline está realizando testes clínicos com a vacina para vírus papiloma humano e a Protein Science Corporation está iniciando a fase III dos testes clínicos para vacina contra gripe. Protein Science Corporation desenvolveu tecnologia em larga escala (600L) para produção de proteínas em células de

inseto utilizando baculovírus. A companhia já testou vacinas provenientes de proteínas recombinantes para AIDS, malária, câncer e gripe nas fases I e II dos estudos clínicos, estabelecendo o caminho para o registro regulatório.

3.3 Células de inseto: *Drosophila melanogaster*

As células de *Drosophila melanogaster* começaram a ser estudadas em 1909 pelo americano Thomas Hunt Morgan e nesse estudo ele conseguiu demonstrar as teorias de Mendel. Essas células são ainda hoje estudadas e representam grande importância para a genética e para a bioquímica. Dos quase 300 genes identificados no genoma humano e responsáveis por doenças hereditárias, mais da metade têm genes análogos no genoma da *Drosophila* (COELHO, 2002).

Nos últimos 10 anos as células de inseto de *Drosophila melanogaster*, linhagem S2, tem sido destaque em estudos e na expressão de proteínas recombinantes, incluindo moléculas de adesão de células (BELLOSTA et al., 1995), antígenos virais (BRIGHTY et al., 1991; BRIGHTY e ROSENBERG, 1994; DEML et al., 1999), oncogenes (GETLER et al., 1995), anticorpos (KIRKPATRICK et al., 1995), receptores (JOHANSON et al., 1995) e fatores de transcrição (COUREY e TJIAN, 1998). Na maioria dos casos, as proteínas testadas foram processadas corretamente gerando moléculas estáveis e biologicamente ativas. Entretanto, há pouca informação disponível sobre parâmetros cinéticos relacionados ao uso da célula de *Drosophila melanogaster* em bioprocessos, gerando a necessidade de adaptação e aperfeiçoamento de conhecimentos concernentes à engenharia de bioprocessos para satisfazer esta nova demanda tecnológica.

Existem no mínimo 94 diferentes linhagens oriundas de *Drosophila* cultiváveis, onde aproximadamente 12 são facilmente obtidas. Com o propósito de expressão gênica, a maioria dos estudos tem utilizado as linhagens Schneider S2 e S3 ou derivações da linhagem

Ohanession Kc, que são facilmente mantidas em cultura (McCARROLL E KING, 1997). A linhagem Schneider S2 foi estabelecida a partir de culturas primárias embrionárias (SCHNEIDER, 1972) e foi desenvolvida como sendo um sistema de expressão baseado na utilização de plasmídeos e, portanto, não-lítico, para a secreção de proteínas humanas funcionais. As células S2 possuem muitas vantagens como sistema de expressão recombinante, incluindo uma melhor glicosilação que células de levedura e *E. coli*, crescem facilmente em temperaturas entre 22 e 27°C, não requerem a utilização de incubadora de CO₂ e possibilitam altos rendimentos de proteínas quando comparado a células de mamíferos (HWA e HYUNG, 2002; HWA, HYE e HYUNG, 2003).

A Tabela 3.5 mostra algumas proteínas que foram expressas utilizando células de *Drosophila melanogaster*.

Células de *Drosophila* S2 podem ser transfectadas com um vetor de expressão recombinante para analisar a expressão transiente da proteína de interesse ou em combinação com vetores de seleção pCoHygro ou pCoBlast, por exemplo, para gerar linhagens de células estáveis (INVITROGEN, 2003). Um aspecto único das células de inseto S2 é a possibilidade de integração de mais de 1000 cópias do vetor de expressão em apenas um evento de expressão e seleção, não sendo necessário, portanto, um longo período para amplificação do plasmídeo e seleção das células clonadas para estabelecer uma linhagem celular com altos níveis de expressão do gene introduzido (DEML et al., 1999).

Em estudos recentes, Swiech (2007) concluiu que, de maneira geral, a célula S2 é uma boa alternativa a ser considerada na escolha de uma célula para a produção de proteínas recombinantes em escala industrial. A célula apresenta um crescimento superior às demais células empregadas nos bioprocessos atuais, e apresenta também uma notável resistência aos estresses gerados ao longo do cultivo. É resistente a condições de hipóxia, a altas agitações e às altas concentrações de metabólitos tóxicos, sem morte celular significativa.

Tabela 3.5. Proteínas expressas por células de *Drosophila melanogaster* (Adaptado de INVITROGEN, 2003).

Proteína	Características da Biomolécula	Rendimentos	Referência
Enzimas			
Dopamina Humana β -hidroxilase	secretado, glicosilado	>16 mg.L ⁻¹	Li et al., 1996
Plasminogênio Humano	secretado	10-15 mg.L ⁻¹	Nilsen e Castellino, 1999
Proteínas Virais			
HIV-1 gp120	secretado, glicosilado	2 mg.L ⁻¹	Culp et al., 1991
HIV-1 gp 160	secretado, glicosilado, processo proteolítico	n.d.	Brighty e Rosenberg, 1994; Ivey-Hoyle e Rosenberg, 1990
HIV-1 proteína regulatória Rev	n.d.	n.d.	Ivey-Hoyle e Rosenberg, 1990
Anticorpos			
Ig G ₂ Humano	secretado	> 1mg.L ⁻¹	Kirkpatrick et al., 1995
Fragmento variável de cadeia única de camundongo (scFv)	secretado	20 mg.L ⁻¹	Reavy et al., 2000
Citocinas			
Interleucina Humana 5 (IL5)	Dímero, secretada, glicosilada, pontes dissulfeto	22 mg.L ⁻¹	Johanson et al., 1995
Interleucina Humana 12 (IL12)	Heterodímero, secretada, glicosilada, pontes dissulfeto	10 mg.L ⁻¹	Lehr et al., 2000
Receptores			
Receptor Humano IL5 Cadeia α (membrana limitada e forma solúvel)	proteína de membrana	17 e 10 mg.L ⁻¹ , respectivamente	Johanson et al., 1995
Receptor Humano Eritropoetina	secretado	5 mg.L ⁻¹	Lehr et al., 2000
Receptor Humano Glucagon	glicosilação proteína de membrana	250 pmoles/mg proteína de membrana	Tota et al., 1995
Heterodímero MHC classe II I-Ed $\alpha\beta$		0,1 – 0,4 mg.L ⁻¹	Wallny et al., 1995
Receptor acetilcolina muscarínico <i>Drosophila</i>	glicosilação proteína de membrana	2,4 pmoles/mg proteína de membrana	Millar et al., 1995
Receptor <i>Drosophila</i> GABA	proteína de membrana	2,7 pmoles/mg proteína de membrana	Millar et al., 1994
Receptore acoplado de proteína G <i>S. calcitrans</i> STKR	n.d.	n.d.	Torfs et al., 2000
<i>Rat calcitonin receptorlike Receptor</i>	glicosilação	n.d.	Aldecoa et al., 2000
Proteína de adesão celular			
<i>Drosophila Notch</i> , Delta	n.d.	n.d.	Fehon et al., 1990
<i>Drosophila Choptin</i>	GPI-ancorado	~1 μ g/10 ⁶ células	Krantz e Zipursky, 1990
<i>Drosophila Fasciclin I</i>	glicosilação, GPI-ancorado	0,5 mg.L ⁻¹	Wang et al., 1993
Oncogenes			
H-ras (mutante Val ¹²)	n.d.	0,2 – 0,5% de proteína celular total	Johansen et al., 1989

n.d. – não disponível

3.4 Metabolismo de células de inseto

Dentre os compostos de relevância no cultivo de células de inseto destacam-se as fontes de carbono e nitrogênio, glicose e glutamina e os produtos metabólicos lactato e amônio. O conhecimento do metabolismo da célula de inseto é essencial para a formulação de um novo meio de cultura, para o planejamento de estratégias de alimentação e para se obter altas produtividades, tanto de células quanto de produto (IKONOMOU et al., 2003).

Nas linhagens de células de inseto existentes há características metabólicas particulares de cada linhagem ou pelo menos de grupos de linhagens. O delineamento destas características é uma tarefa complicada devido à complexidade das reações metabólicas, mas especulações podem ser feitas a partir das observações experimentais.

A caracterização dos substratos necessários ao crescimento celular, suas concentrações mínimas no meio de cultura, seus efeitos quando na ausência ou excesso, entre outros fatores, podem levar à definição de um meio de cultura mais adequado para a obtenção de crescimento celular expressivo e possibilitar altos rendimentos de produto recombinante.

Contudo, a fisiologia de uma dada linhagem celular é uma característica própria e as diferentes composições de cada meio de cultura fazem com que as estratégias de cultivo definidas para um determinado meio não sejam totalmente aplicáveis à outro. Por exemplo, a necessidade de suplementação com um determinado aminoácido num certo momento do cultivo pode variar de um meio de cultura para outro. Assim, as observações preliminares quanto às características da célula podem e devem ser utilizadas na escolha da suplementação do meio de cultura, atentando-se, contudo às condições de cultivo.

Não foram encontrados na literatura estudos detalhados relacionados à fisiologia das células de *Drosophila melanogaster* em cultura. Embora se conheçam algumas informações sobre as principais rotas metabólicas que a *Drosophila* tem a capacidade de realizar, um

melhor entendimento do metabolismo destas células em cultura, com o objetivo de desenvolver um bprocesso otimizado, deveria ser uma das prioridades de pesquisa atualmente. O estudo da fisiologia de insetos em geral e da *Drosophila melanogaster* em particular, se faz necessário devido a uma série de peculiaridades apresentadas pelo comportamento dos insetos, algumas das quais são bem diferentes das dos mamíferos.

3.4.1 Metabolismo de carboidratos

A glicose é considerada o carboidrato mais importante para o crescimento de células de inseto (BENSLIMANE et al., 2005). Em culturas de células Sf9 em batelada utilizando o meio de cultura TNM-FH, o consumo total da glicose coincide com o término da fase de crescimento exponencial, mesmo quando outras fontes de carbono como frutose e lactato estão presentes. Quando a glicose é seletivamente removida do meio de cultura, o consumo de frutose e lactato origina um crescimento celular inferior ao das culturas contendo glicose (MENDONÇA et al., 1999). Drews et al. (1995), estudando o crescimento de células de inseto Sf9 em meio TNM-FH, também identificaram a glicose como sendo a fonte de carbono e fonte de energia preferencial. Após o consumo de glicose, ocorreu o consumo de frutose e ácido málico. O término do crescimento celular coincidiu com o completo consumo de frutose, indicando que as outras fontes de carbono ainda existentes no meio de cultura, como por exemplo, malato e sacarose, não favorecem o crescimento celular.

Ao ser consumida, a glicose produz lactato como principal metabólito. A glutamina é outro nutriente muito consumido, podendo ser convertida em glutamato, alanina e amônio. A quantificação do fluxo metabólico de célula Sf9 demonstrou que essas células processam completamente o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) funcional (BHATIA et al. 1997), além disso, é comprovada a baixa produção de lactato sobre condições de estresse anóxico.

Na Figura 3.1, são apresentadas as rotas metabólicas de consumo de glicose e glutamina e formação de lactato e amônio de células Sf9.

Estudos realizados por Drews et al. (2000) mostram que em meios de cultura nos quais não se dispõe de glicose, nutrientes alternativos podem ser consumidos, resultando, no entanto, na redução da taxa de crescimento celular. Os autores verificaram ainda que a glicose excedente no meio de cultura provoca a formação preferencial de alanina. Ao mesmo tempo, a formação deste metabólito é suprimida em virtude da completa escassez de glutamina do meio de cultura.

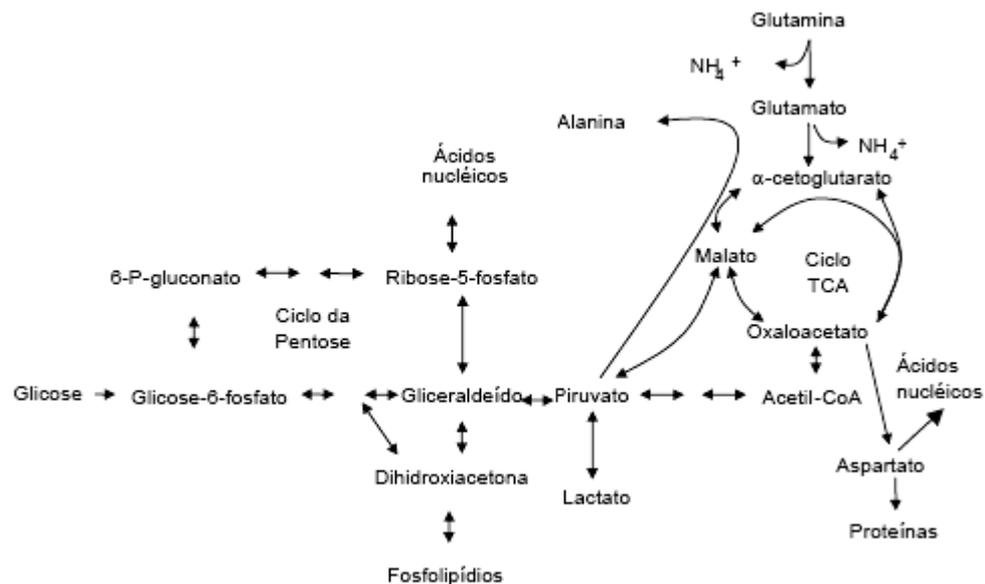


Figura 3.1. Esquema das principais vias metabólicas para a Sf9 (Adaptado de ÖHMAN et al., 1995).

A faixa e eficiência da utilização de carboidratos diferem nas linhagens de células de inseto. Stockdale e Gardiner (1976) estudaram a utilização de 21 açúcares para o crescimento das células de inseto *Trichoplusia ni* (TN 368) e determinaram que apenas cinco favorecem o crescimento celular: glicose, frutose, manose, maltose e trealose. Glicose e trealose são consumidas em uma maior velocidade quando comparada à frutose. Reuveney et al. (1992) também demonstraram que as maiores densidades celulares (células Sf9) e produção de

proteína recombinante (β -galactosidase) foram atingidas em meios contendo glicose ao invés de frutose ou maltose. As altas velocidades de consumo de glicose e outros intermediários glicolíticos em várias culturas demonstram a presença de um metabolismo glicolítico ativo em células de insetos. No entanto, uma vez que lactato e piruvato são incapazes de promover o crescimento de células Sf9 (REUVENEY et al., 1992) a glicogênese pode não estar atuando de maneira eficiente para facilitar o crescimento celular na ausência de substratos glicosídicos.

O metabolismo de carboidratos em células S2 é ainda desconhecido, porém estudos sugerem que a glicose seja a principal fonte de carbono e, provavelmente, a trealose seja um nutriente essencial para o crescimento desta linhagem celular (GUY, 1997).

3.4.2 Metabolismo de aminoácidos

Células de inseto utilizam aminoácidos para síntese de biomassa e geração de energia. Aminoácidos como glutamina, glutamato, aspartato, serina, arginina e metionina são utilizados para produção de energia (IKONOMOU et al., 2003). A maioria dos aminoácidos (histidina, lisina, treonina, glicina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptofano e isoleucina) consumidos durante a fase de crescimento celular é incorporada em proteínas celulares. A oxidação destes aminoácidos para produção de energia é insignificante. Glutamina e ácido aspártico (indiretamente também glutamato, asparagina e serina) podem ser utilizados para síntese de ácidos nucleicos. Serina pode ser utilizada para síntese de glicina, e metionina para síntese de cisteína (DREWS et al., 1995).

Dentre os aminoácidos mais utilizados pelas células de inseto, encontra-se na literatura maior enfoque para a glutamina. Benslimane et al. (2005), realizaram estudos através da

marcação radioativa de carbono e apontaram a utilização da glutamina como fonte de carbono para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

A glutamina consumida pode ser convertida em glutamato e amônio, mas em alguns casos a glutamina pode ser sintetizada pelas próprias células em quantidades capazes de suprir o crescimento celular (ÖHMAN et al., 1996).

A limitação de glutamina no meio de cultura força o consumo de aminoácidos como aspartato (fortemente consumido em culturas de Sf9 em batelada) seguido do glutamato e da asparagina. Na ausência de glutamina, os aminoácidos metionina e tirosina também podem ser consumidos pelas células Sf9 (MENDONÇA et al., 1999). Células de insetos podem necessitar de aspartato e glutamato, que são precursores de oxaloacetato, que normalmente promove um aumento do fluxo de metabólitos para o ciclo TCA (ciclo dos ácidos tricarboxílicos).

A suplementação de metionina e tirosina ao meio de cultura de células Sf9 retarda a morte celular (MENDONÇA et al., 1999). Adição de metionina e cisteína é crítica para o crescimento de duas linhagens de células de inseto no meio livre de soro IBL10 (VAUGHN e FAN, 1997) e cisteína é o único aminoácido completamente consumido em culturas de altas densidades de células Sf9. No entanto, Doverskog, Han e Häggström (1998) demonstraram que células Sf9 podem crescer em meio livre de cisteína, desde que a cultura seja iniciada com células com uma idade de inóculo de 47-53 horas. Neste caso, mais metionina foi consumida pelas células, sendo utilizada na biossíntese de cisteína. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que o crescimento de células Sf9 e Sf21 é possível em meio livre de glutamato, glutamina e aspartato na presença de íons amônio (ÖHMAN et al., 1996). No entanto, Mendonça et al. (1999) notaram que a privação de glutamina pode afetar o crescimento celular e sua síntese pelas células de inseto não é tão eficiente quanto seu fornecimento no meio de cultura.

Alguns estudos sugerem que culturas de células de inseto com excesso de glicose e glutamina produzem alanina como subproduto metabólico, mas variações são decorrentes de cada tipo de célula. Por exemplo, para células Tn-5 ocorre acúmulo de lactato, alanina e íons amônio em excesso de glicose e glutamina, mas células Sf9 se diferenciam neste sentido, pois mesmo em excesso destes substratos não apresentam acúmulo de lactato e amônio. Entretanto íons amônio podem se acumular em meio com baixa concentração de glicose. Já a alanina é um metabólito comum em presença ou escassez de glicose (RHIEL et al., 1997).

Com bastante especificidade, Drews et al. (2000), propuseram uma rota metabólica para glutamina e glicose através de marcação de carbono e nitrogênio. Esta proposta é resumida na Figura 3.2.

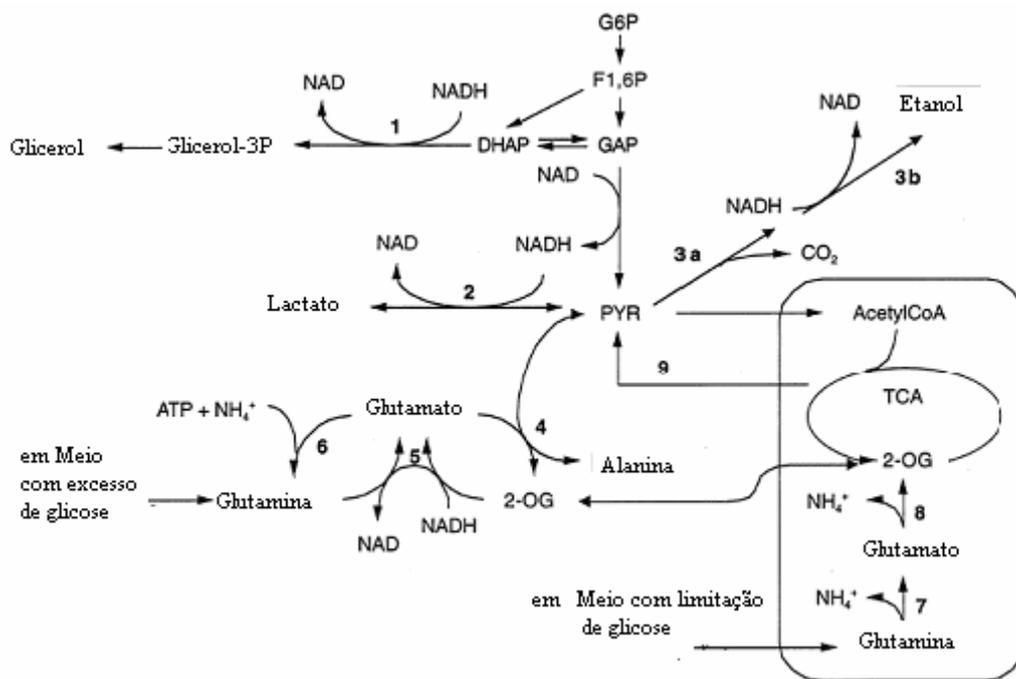


Figura 3.2. Metabolismo de aminoácidos proposto para células Sf9. Abreviações : GP6-glicose-6-fosfato ; F1,6P-frutose-bifosfato ; GAP- gliceraldeído fosfato ; HAP –dihidroxiketona fosfato ; PYR- piruvato ; 2-OG-2-oxiglutarato ; Enzimas : 1-DHAP desidrogenase ; 2-lactato desidrogenase ; 3.a-piruvato decarboxilase ; 3.b-etanol desidrogenase ; 4-glutamato-piruvato transaminase ; 5-glutamato sintase ; 6-glutamina sintetase ; 7-glutaminase ; 8-glutamina desidrogenase ; 9- fluxo do TCA de volta pra glicólise (Adaptado de DREWS et al.,2000).

Pela rota metabólica proposta através da marcação de nitrogênio, os pesquisadores identificaram que os doadores de nitrogênio para a formação de alanina são o grupo amina da glutamina e o grupo amida do glutamato. As investigações apontaram também para a ação de amidotransferases das células Sf9 e não das vias de glutaminase e glutamato desidrogenase, além da observação de o metabolismo de glutamina não ser sensível à concentração de glutamato extracelular. Por outro lado, para a formação de íons amônio, estariam envolvidas glutaminase e glutamato desidrogenase.

Com relação ao metabolismo de glicose observou-se que este composto ao participar do TCA é convertido em moléculas de 3 carbonos e alanina. Além disso, mesmo em meio que possui glutamina, este aminoácido é sintetizado à partir de glicose.

Podem ser encontrados outros trabalhos na literatura que fazem a análise quantitativa da glutamina no sentido de identificar a concentração mínima necessária nas formulações de meio de cultura. Ikonou et al. (2001) citam a exaustão de glutamina em cultivo em biorreator, em meio YPR, partindo de uma concentração inicial de 2,0 g.L⁻¹, mas não consideram este substrato limitante nestas concentrações.

Além da glutamina, trabalhos apontam para o consumo de cisteína por células Sf9. Radford, Reid e Greenfield (1997) realizaram cultivos de células Sf9 em meio Sf-900 II, em biorreator e observaram que o único aminoácido completamente consumido foi a cisteína, podendo-se atribuir a isto o fim do crescimento exponencial. Coincidente à sua exaustão foi observado o fim do consumo de outros aminoácidos, ou seja, tudo indica que a exaustão de cisteína compromete o metabolismo celular. Além disso, observou-se o comportamento deste aminoácido como limitante na produção de proteína recombinante, uma vez que sua exaustão aconteceu 60 horas pós-infecção e foi relacionado à diminuição do rendimento de proteína recombinante.

3.4.3 Metabolismo do oxigênio

No metabolismo celular, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons na cadeia respiratória, sendo então reduzido à água, permitindo que ocorra a re-oxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise e do TCA (ciclo do ácido tricarboxílico), e a estocagem de energia através da transformação das moléculas de ADP em moléculas de ATP, fundamentais para o funcionamento da máquina celular (manutenção, crescimento, síntese de produtos, transporte ativo entre outros). Portanto, desde que se objetivem cultivos com elevadas velocidades de crescimento celular, o que significa altas velocidades de consumo de fontes de carbono, a fim de que ocorra a abundância de elétrons na cadeia respiratória e geração de ATP, deverá haver também, necessariamente, quantidade suficiente de oxigênio dissolvido para que estes elétrons possam ser drenados ao final da cadeia (BAILEY e OLLIS, 1986).

O oxigênio é considerado essencial na cultura de células animais e, portanto, deve ser considerado como um nutriente no meio de cultura. O controle da concentração de oxigênio dissolvido (OD) em níveis apropriados assegura que o crescimento celular não seja limitado pelo oxigênio e que a formação de radicais livres, que são prejudiciais para células animais, seja evitada (KAMEN et al., 1996; SCHMID, 1996).

Dentre os fatores que afetam a produção de proteínas recombinantes por células de inseto, a concentração de oxigênio dissolvido é conhecida como decisiva e sua completa exaustão pode ser fatal ao cultivo (SCOTT, BLANCHARD e FERGUSON, 1992). A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido abaixo do nível crítico durante a replicação e infecção celular resulta na produção ineficiente de proteínas recombinantes (GOTOH et al., 2002).

Para diminuir a taxa de consumo de oxigênio pelas células, pode-se utilizar a estratégia de cultura em temperaturas abaixo da faixa ótima de crescimento, o que permite também aumentar a solubilidade deste gás no meio de cultura. Gotoh et al. (2004) determinaram que o cultivo de células de inseto Sf9, infectadas ou não, tem seu q_{O_2} diminuído em função da diminuição da temperatura, produzindo proteínas recombinantes de maneira adequada.

3.4.4 Acúmulo de subprodutos

Células de inseto acumulam lactato em baixos níveis. Essa é a principal diferença em relação às células de mamíferos, que tem uma baixa relação glicose/lactato em cultura em batelada, e apenas pequenas quantidades de glicose são oxidadas a dióxido de carbono. Não obstante, o lactato pode ser produzido sob condições de estresse provocado pela limitação de oxigênio (IKONOMOU et al., 2003). Em algumas situações, o lactato pode ser consumido, sendo possivelmente um substrato alternativo para o suprimento de carbono ou energia ao metabolismo celular, proporcionando a produção de piruvato, através da enzima lactato desidrogenase, formando ácido α -cetoglutarato, composto resultante do TCA (BATISTA, 2003).

Células Sf9 não produzem lactato em condições de cultivo não limitado por oxigênio, mesmo em meios de cultura contendo altas concentrações de glicose. No entanto, células High-Five tendem a acumular lactato em níveis variando de 7 a 16mM em culturas em suspensão (SUGIURA e AMANN, 1996; YANG et al., 1996). A produção de lactato pode ser resultado do acúmulo até mesmo depois da adaptação para o crescimento em suspensão (IKONOMOU et al. 2001). No entanto, a composição do meio de cultura pode também desempenhar um papel no acúmulo de lactato, como foi demonstrado por Rhiel et al. (1997).

Contudo, o uso do meio não adaptado (Sf-900 II) pela cultura de High-Five conduziu a uma significativa produção de lactato de ~ 45 e 30 mM durante o crescimento e infecção, respectivamente. O efeito inibidor do lactato pode ser específico para cada linhagem de células, como demonstrado ao diminuir o crescimento da célula BM-5 na concentração de 8 mM de lactato (STAVROULAKIS et al. 1991).

Outro importante produto catabólico em cultura de células animais é a amônia. Os mecanismos do efeito tóxico ou inibitório da amônia nas células ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se, no entanto, que a amônia ou amônio podem tanto perturbar o pH intracelular e intra-organela e os gradientes eletroquímicos, bem como interagir diretamente com determinadas enzimas (SCHNEIDER et al., 1996). O crescimento de células de inseto Sf9 e BTI-EAA não é afetado pela adição de 10 mM de amônia na forma de NH_4Cl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (BEDÁRD, TOM e KAMEN, 1993). A adição de 30mM de NH_4Cl à células “High-Five” afeta o crescimento de maneira desprezível, mas compromete severamente a produção de proteína recombinante (YANG et al., 1996). De acordo com Rhiel et al. (1997), células Sf9 não acumulam amônia no meio de cultura, enquanto que células “High-Five” a acumulam em concentrações dependentes da concentração inicial de glutamina e asparagina. Determinados estudos em relação ao acúmulo de amônia em cultura de células de inseto indicaram que esse acúmulo não atinge níveis tóxicos a menos que ocorra exaustão de glicose (BÉDARD, PERRET e KAMEN, 1997; ÖHMAN et al., 1996). Células Tn-5 podem acumular altos níveis de amônia no final da cultura, acima de 20 mM, e demonstram possuir um metabolismo semelhante ao de células de mamíferos (BENSLIMANE et al., 2005).

Öhman et al. (1995), utilizando cultivos de células Sf9 limitados com glutamina e glicose, demonstraram que em condições de excesso de glicose, alanina é formada, enquanto que em condições de limitação de glicose, amônia é produzida devido à glutaminólise.

Condições similares também foram observadas em outros trabalhos (BÉDARD et al., 1993; DREWS et al., 1995).

Drews et al. (1995) estudaram o crescimento de células Sf9 em IPL-41 em diferentes concentrações de alanina. Apesar de ser um subproduto, as concentrações de alanina estudadas (até 2g.L^{-1}) não exerceram efeito inibitório no crescimento celular.

Os subprodutos podem estar relacionados à adição de nutrientes requeridos pelas células. Esta adição pode ter efeito negativo na densidade celular, pois o metabolismo da célula de inseto resulta na formação de subprodutos que podem ter um efeito inibidor na atividade metabólica.

3.5 Meios de cultura para células de inseto

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 de Grace no cultivo de tecidos de célula de inseto. A composição do meio de 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. Geralmente, os meios basais requerem suplementação com 5-10% de soro fetal bovino (SFB). Quando os meios são utilizados em culturas em suspensão, metil celulose ou Pluronic F-68 são adicionados como aintiespumante. Muitas das linhagens de células lepidópteras comumente usadas crescerão bem em qualquer um desses meios, e apresentarão uma fácil adaptação de um para outro (VAUGHN, USDA e MARYLAND, 1999). Na Tabela 3.6, estão listados os principais meios desenvolvidos suplementados com SFB.

Inicialmente, meios contendo SFB mostraram-se particularmente benéficos para a cultura de células de inseto, porém, além da dificuldade no momento da purificação do produto devido a presença do soro, problemas como inconsistência lote a lote, suprimento limitado e presença de outras proteínas podem limitar sua utilização em cultivo de células de inseto. A utilização do soro pode também envolver o risco de contaminação por micoplasma ou vírus. 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, GREENFIELD e REID, 1998).

Tabela 3.6. Meios suplementados com SFB para cultura de células de inseto (Adaptado de SILVA, 2006).

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

Os meios livres de soro levam a vantagens como, por exemplo, aumento do rendimento celular e de proteínas recombinantes, eliminação de agentes exógenos e facilidade nos processos de purificação do produto, reduzindo, conseqüentemente, o custo final. A utilização de meios livres de soro também possui vantagens em relação aos aspectos regulatórios. Na Tabela 3.7 estão listados alguns meios disponíveis comercialmente para

cultura células de inseto e para tecnologia de rADN (ácido desoxirribonucléico). Deve-se ressaltar que há inúmeros meios livres de soro (MLS) no mercado.

Os problemas com o uso de MLS surgem do não conhecimento total das necessidades nutricionais das células, sendo impossível prever 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, sendo que o soro exerce um importante papel na veiculação de substâncias lipossolúveis. 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).

Tabela 3.7. Meios livres de soro (MLS) comercialmente disponíveis para cultura de células de inseto (Adaptado de SILVA, 2006).

Meio	Característica principal	Aplicação	Linhagem celular
Sf-900 II	Livre de proteína e soro	Usado para sistema de vetor de expressão baculovírus (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>)

3.6 Cultivo de células de inseto em biorreatores

O coração de um bioprocessamento para produção de um produto biológico é o biorreator (MUTHARASAN, 1996). Este sistema de cultivo deve garantir a esterilidade do processo e

garantir o controle e monitoramento dos principais parâmetros do processo (temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido, agitação).

Nos anos 80 muitos tipos de reatores foram propostos para o desenvolvimento de processos envolvendo células animais. Pontos críticos para o aumento de escala incluíam suprimento de oxigênio, necessidade de mais sofisticados processos de controle, sensibilidade das células ao cisalhamento e contaminação. Estas dificuldades estimularam um grande número de estudos sobre o assunto (CHU e ROBINSON, 2001).

No cultivo de células de inseto, existem dois parâmetros centrais a serem considerados para o projeto de um biorreator e aumento de escala. Primeiramente, a necessidade de satisfazer os requerimentos para respiração aeróbica em condições físico-químicas, mecânicas e geométricas impostas para uma agitação homogênea e suprimento de oxigênio de maneira tal que a célula fique protegida do estresse hidrodinâmico. Segundo, a busca por produtividade máxima de vírus ou proteína, que pode ser conseguida através do aumento da expressão gênica por célula ou do aumento da densidade celular por volume de reator.

Os biorreatores para o cultivo de células de inseto e de células animais em geral, podem ser distinguidos levando em consideração o método base para a cultura das células (suspensão, aderida a uma superfície, imobilizada) e a forma de cultivo (batelada, batelada alimentada, contínuo, semi-contínuo, perfusão).

Biorreatores podem ser operados de diferentes maneiras relacionadas ao modo como os nutrientes são fornecidos para as células. Células de inseto já foram cultivadas em biorreatores operando em batelada, batelada alimentada, semi-contínuo e perfusão. Biorreatores de tanque agitados (BTA) operados em batelada são os mais utilizados devido à simplicidade, baixo custo e facilidade no aumento de escala. Apesar deste tipo de cultura ser limitado devido à exaustão de nutrientes-chave ou ao acúmulo de subprodutos tóxicos, o cultivo em batelada, se iniciado com um meio de cultura cuidadosamente formulado, pode

resultar em ótimos rendimentos com mínimo custo (VAUGH et al., 1999). No entanto a utilização de outros modos de operação tem se tornado mais intensa uma vez que a alimentação do biorreator com nutrientes pode reduzir a formação de subprodutos tóxicos e a flutuação nas concentrações dos nutrientes-chave, aumentando tanto o rendimento celular quanto a produtividade da proteína recombinante (CHU e ROBINSON, 2001).

O processo de perfusão é um modo de operação que é empregado há muito tempo no cultivo de células animais. São ensaios contínuos onde as células são constantemente nutridas com meio fresco. Deutschmann e Jäger (1994) mantiveram células Sf21AE em crescimento exponencial por 16 dias em um biorreator em perfusão de 1,4 L; a concentração celular máxima atingida foi de $5,5 \times 10^5$ cel.mL⁻¹. Sondergaard (1996) realizou o cultivo de células de *Drosophila* em biorreator com oxigenação realizada através de um tubo de silicone, agitação de 75 rpm e temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ operando em três diferentes modos: batelada, semi-batelada e contínuo. Os sistemas em batelada e semi-batelada foram realizados com o meio de cultura Schneider's com 10% de soro fetal de bezerro e o contínuo, realizado com meio livre de soro D-22. A maior concentração celular foi obtida no cultivo realizado em semi-batelada ($2,9 \cdot 10^{10}$ cel.L⁻¹), seguido dos cultivos de forma contínua ($2,0 \cdot 10^{10}$ cel.L⁻¹) e batelada ($0,83 \cdot 10^{10}$ cel.L⁻¹).

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 resultaram em uma concentração celular final de $1,2 \times 10^7$ células.mL⁻¹. O alto rendimento obtido com as células de inseto S2 recombinante demonstra a viabilidade desse processo em biorreatores. A Tabela 3.8 exemplifica os diferentes modos de operação de um biorreator no cultivo de células de inseto.

Tabela 3.8. Estratégias de alimentação para a produção de proteínas recombinantes em células de inseto (adaptado de IKONOMOU et al., 2003).

Linha-gem Célula	Estratégia de alimentação	Meio	X_{max} (10^6 cel.mL ⁻¹)	Proteína	P_{max}	Referência
Troca de meio						
Sf9	Troca total antes da infecção	Sf-900 II	21,6	β -Gal	$14,1 \times 10^5$ U.mL ⁻¹	Radford et al., 1997
Sf9	Troca total após infecção	Sf-900 II	9,0	EGFR-ED	6,4 mg.L ⁻¹	Tom et al., 1995
Sf-21	Concentração Gln (9mM) e O ₂ (80%) elevadas	Ex-Cell 400	7,0	β -Gal	855 IU.mL ⁻¹	Taticek e Shuler 1997
			6,4	SEAP	26,2 U.mL ⁻¹	
Sf9	Adição 10x sol. aa e 50x EL na infecção	Sf-900 II	6,6	β -Gal	240,7 IU.mL ⁻¹	Bédard et al., 1994
Batelada Alimentada						
Sf9	Uma adição de Glc, aa, lipídios, EL e sol. vitaminas, ferro e traços de metais	Sf-900 II	30	β -Gal	895 U.mL ⁻¹	Bédard, Perret e Kamen, 1997
Sf9	Uma adição de EL levedura, aa e lipídios	Sf-900 II	7,5	β -Gal	$14,7 \times 10^5$ U.mL ⁻¹	Chan, Greenfield e Reid., 1998
Sf9	Alimentação exponencial de EL e aa	Grace's+ 5% SFB+ 0,4% EL	5,5			Kim et al., 2000
Sf9	Um pulso e duas semi-contínuas como Bédard et al., 1997	Sf-900 II	52	β -Gal	372 U.mL ⁻¹	Elias et al., 2000
Sf-21	Batelada alimentada c/ adição Glc, EL e aa	TNM-FH + 10% SFB	19	hIL-5	$3,5 \times 10^6$ U.mL ⁻¹	Chiou, Hsieh e Ho, 2000
High-Five	Múltiplas adições de Glu e Gln baseadas no pH	Ex-Cell 401	2	VP2H	54 mg.L ⁻¹	Wang e Doong, 2000
S2Ac GPV	Batelada alimentada com adição de aa	Sf-900 II	23	GPV	0,11 ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹	Swiech, 2007
Perfusão						
Sf9	Perfusão c/ filtro tangencial externo	TNM-FH + <=1% SFB	15	VP6		Caron et al., 1994

Continuação Tabela 3.8

High-Five	Perfusão c/ membrana interna de polipropileno	Ex-cell 401 Glc (4g.L ⁻¹) Gln (4mmol.L ⁻¹)	4	βTP	>1,200 g.L ⁻¹ .dia ⁻¹	Chico e Jäger, 2000
-----------	---	---	---	-----	---	------------------------

Glc – glicose, GLN – glutamina; EL – extrato de levedura; aa – aminoácidos; SFB – soro fetal bovino

β-Gal - β-galactosidase; EGFR-ED – domínio do receptor extracelular do fator de crescimento epidermal; SEAP – fosfatase alcalina secretada; hIL-5 – Interleucina humana -5; VP2H – Proteína estrutural do vírus da infecção da doença do saco bursal; VP6 – proteína nucleocapsulada do rotavírus bovino.

A mais promissora abordagem para células de inseto envolve o cultivo em suspensão utilizando uma tecnologia de biorreatores já aplicada com sucesso para a produção de produtos microbianos e de células de mamíferos. O crescimento de células de inseto em suspensão tem sido desenvolvido em uma grande variedade de reatores como, frasco spinner, tanque agitado e airlift (GOOSEN et al., 1993), como pode ser observado na tabela 3.9.

O biorreator ideal para ótimo crescimento celular e produção de proteínas é aquele que fornece um ambiente homogêneo e pode ser facilmente controlado. Estas condições podem ser atingidas em biorreatores de tanque agitado, que são os preferidos no aumento de escala de células em suspensão. Os parâmetros básicos de um processo biotecnológico como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, dentre outros, são medidos e controlados utilizando dispositivos padrões disponíveis nos biorreatores de tanque agitado comerciais (KRETZMER, 2002).

Os biorreatores convencionais de tanque agitado têm sido utilizados para cultivo de células em larga escala com volumes variando de 2 a 10.000 litros (CHU e ROBINSON, 2001). Biorreatores de tanque agitado possuem diversas vantagens que os tornam adequados para a produção em escala industrial e laboratorial. Possibilitam tanto o crescimento de células em suspensão quanto células dependentes de ancoramento, possuem facilidade de aumento de escala, provêm um ambiente homogêneo para o crescimento celular e

possibilitam o controle da qualidade do produto de maneira relativamente fácil. São, portanto, ferramentas importantes na produção de biofármacos (WANG et al., 2005). Agathos (1996) destaca como atrativos básicos do BTA a disponibilidade e conveniência para diferentes usos (sistemas com uso de células animais ou microorganismos) e a longa experiência em projeto e entendimento dos princípios de aumento de escala e a grande quantidade de informações disponíveis na literatura, com numerosos trabalhos fazendo uso deste tipo de biorreator. Biorreatores BTA também possuem algumas desvantagens como, por exemplo: sua agitação mecânica produz cisalhamento o que pode danificar as células. No entanto, os danos podem ser reduzidos com a mudança do tipo de impelidor, sistemas de aeração mais brandos (membranas) e adição de agentes protetores.

Dentre as possibilidades de cultivo de células de inseto em suspensão com relativa facilidade para aumento de escala, podem-se citar também os biorreatores airlift. Este tipo de biorreator tem sido descrito como sendo de fácil projeto e construção quando comparado a biorreatores tanque agitado, conseqüentemente originando baixos custos de implementação e manutenção e riscos reduzidos de contaminação (AGATHOS, 1996). O biorreator de circulação interna consiste de dois tubos concêntricos. O ar é aspergido na base do tubo interior – tubo ascendente (“riser”). À medida que as bolhas de ar sobem, a diferença de densidade do meio no tubo interior e no tubo exterior – tubo descendente (“downcomer”) resulta na circulação do meio e das células sem a necessidade de uma agitação mecânica. Os danos causados devido à turbulência e forças resultantes dos turbilhões no final dos impelidores são evitados neste tipo de biorreator, conseqüentemente, sendo muito utilizado para o crescimento de células “frágeis” (VAUGH et al., 1999).

Tabela 3.9. Cultivo de células de inseto em cultura em suspensão: uma comparação das técnicas de cultura (adaptada de GOOSEN et al., 1993).

Linhagem de célula	Meio	Tipo de biorreator	Tensão de cisalhamento crítica N/m ²	Máxima densidade células (células/mL) x10 ⁻⁶	Comentários	Referências
Aedes albopictus	Eagle's modificado 10% FBS	n.d.	n.d.	n.d.		Spradling et al., 1975
Schneider <i>Drosophila</i>	Eagle's modificado 10% FBS	Frasco spinner	n.d.	10	Células adaptadas para o crescimento em cultura em suspensão	Lengyl, Spradling e Renman, 1975
TN-368	TNM-Fh modificado 10% FBS	Frasco spinner (100mL)	n.d.	2 em 3-4 dias	Aumento do crescimento celular por aeração	Hink, 1970
		Bioflo (400mL)	n.d.	3 em 6-7 dias	0,1% MC alivio de célula acumulada	
		MF-205, (2L)	n.d.			
		Vibromixer-glass	n.d.	Menor que outros reatores utilizados		
TN-368	TNM-FH, SC, 10% FBS	MF-205 (2-31) com impelidor marinho e aspersão de ar	1,5	1,75 em 72 h com antiespumante; 96 h com antiespumante	Adição de 0,02% de antiespumante, aumento de MC de 0,1 para 0,2% para abaixar a tensão de cisalhamento	Hink e Strauss, 1980
Sf-9	BML-TC/10, 10% FBS 0,1% MC	CSTR, 1L	1,5-3,0	3		Tramper, Williams e Joustra, 1986
Sf-9	Base IPL -41 livre de soro com adição de pluronic	Airlift (circulação interno)	n.d.	5		Inlow, Harano e Maiorella, 1987
Sf-21 PLB	Livre de soro, com gema de ovo, nenhum antibiótico	Impelidor agitado (10L)	n.d.	2,4 sem aeração; 4 com aeração	Aeração por difusão através de um sistema de tubo de silicone	Eberhard e Schugerl, 1987
Aedes albopictus	n.d.	Frasco spinner	n.d.	5 a 100 rpm	0,5% CO ₂ em superfície de aeração	Agathos, 1988
		Reator jarra	1,0	n.d.	Adição de 0,1% de meio MC aumentando o crescimento celular	
Sf-9	EX-CELL	Spinner 8L	n.d.	3,9 (6 dias)	A viabilidade celular aumenta com scale-up; sobre viabilidade celular de 90% em frasco de 5 L enquanto abaixo 80% em 40L	Weiss et al., 1988
		Airlift 5L	n.d.	6,4 (8 dias)		
		10L	n.d.	3,0 (12 dias)		
		40L	n.d.	2,4 (8 dias)		
IPLB-Sf-21	Grace's	Frasco shaker (125mL)	n.d.	3,2 (7 dias)	0,2% de pluronic F-68	Wu et al., 1990

n.d. – não disponível; MC – metil celulose.

Reatores airlift oferecem considerável vantagem sobre outros sistemas de cultura para aumento de escala da propagação de células de inseto em culturas em suspensão (MAIORELLA et al., 1988; MERCHUK, 1990; SHAH et al., 1992). Reatores airlift de tubos concêntricos podem ser desenhados para satisfazer simultaneamente a demanda de oxigênio e a moderação do fluxo requerido para a mínima danificação da célula. Trabalhos publicados sobre esse assunto geralmente focalizaram o efeito de ambos, o raio da área da seção transversal para a descida (BELLO 1981; CHISTI e MOO-YOUNG, 1987), a altura do reator (MERCHUK et al., 1992), a seção de separação do gás no topo do reator (SIEGEL e MERCHUK, 1987), e o desenho da seção inferior (BLENKE, 1979). As evidências acentuam a importância da geometria na performance dos reatores airlift, uma vez que a configuração geométrica tem um efeito direto na dinâmica do fluido do sistema (MERCHUK et al., 1994). Embora o desenho de um reator airlift tem sido indicado como um importante fator a ser considerado, poucos artigos específicos são encontrados na literatura que sistematicamente consideram a influência da geometria do reator no comportamento de culturas de células animal em geral, e culturas de célula de inseto em particular.

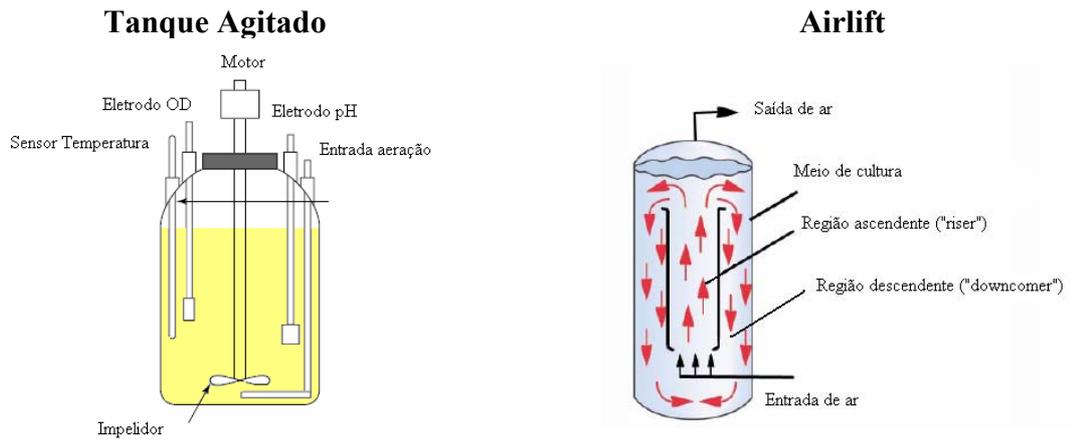
A Tabela 3.10 resume o crescimento de células de inseto em diferentes tipos de biorreatores com diferentes condições de cultivo para a produção de proteínas recombinantes.

Além dos biorreatores convencionais citados acima, células de inseto têm sido cultivadas em novos tipos de biorreator. A Figura 3.3 apresenta uma representação dos biorreatores convencionais e não convencionais utilizados no cultivo de células de inseto.

Tabela 3.10. Características de crescimento de várias linhagens de células de inseto em biorreatores (adaptado de SCHMID, 1996).

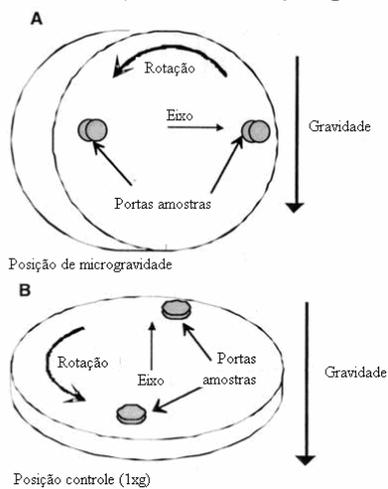
Biorreator	Linha-gem celular	Meio de cultura	Agitação/ aeração	Condições físicoquímicas	Crescimento		Referência
					μ (dia ⁻¹) t_D (h)	(cel.mL ⁻¹)	
BTA 1,4; 2; 6L Perfusão	Sf21	IPL-41, 5% SFB	40 rpm Livre de bolhas	40-100% OD	μ 0,39-0,60	1,7-6,6x10 ⁶ 55x10 ⁶	Deutschmann e Jäger, 1994
BTA 4L Perfusão	Sf9	TNM-FH, 10% SFB	70-80 rpm micro-aspersão	30% OD	μ 0,74 μ 0,36	n.d. 12-15x10 ⁶	Caron et al., 1994
BTA 1,5L	Sf9	TC100, 5% SFB IPL-41, 5% SFB IPL-41 MLS	50 rpm aeração livre de bolhas	40% OD pH 6,2	n.d.	2,3x10 ⁶ 5,5x10 ⁶ 5,6x10 ⁶	Fertig et al., 1993
BTA 2, 10, 150L	Sf21	EX-CELL400 MLS	45 rpm micro-aspersão	40% OD pH 6,2	μ 0,65-0,79	5,0x10 ⁶	Guilume et al., 1992
BTA 1,5L Airlift 0,6L	Sf9	TNM-FH-FH, 5% SFB	200 rpm aspersão 0,05 vvm	50% OD s/ controle pH	μ 0,69-0,88 μ 0,78-0,89	2-2,5x10 ⁶	Murhammer e Goochee, 1988
BTA 8; 18L	Sf9	IPL-41, 2% SFB	aeração livre de bolhas ou micro-aspersão	10-110% OD	μ 0,48-0,65	40-50x10 ⁶	Jain et al., 1991
BTA 5L	Sf9	IPL-41, 10% SFB ICSF-WB MLS	80 rpm aspersão por orifício	65% OD pH 6,2	μ 0,67-0,88 μ 0,69-0,88	4,0-5,0x10 ⁶ 4,0-5,0x10 ⁶	Reuveny et al., 1992
BTA 8L (Spinner) Air-lift 6L	Sf9	Grace's + ext.levedura Lactoalbumina Pluronic	90rpm Aeração 200mL/min 200mL/min	80% OD n.d.	t_D 21,9 t_D 22,5	4,91x10 ⁶ 4,94x10 ⁶	Rice et al., 1993
BTA 1,5L	B. mori	IPL-41, 10% SFB	60-85 rpm arpsensão	10-60% OD pH 6,3	μ 0,46	3,6-4,8x10 ⁶	Zhang et al., 1994
BTA 1,4L (LH)	Sf9	TC-100 5% SFB	100-400rpm Aeração 100ml/min	50% OD	μ 0,21-0,27	2,1-3,0x10 ⁶	Kioukia et al., 1996
BTA 2L (Biostat M) Semi batelada	S2	Schneider	75rpm Aspersão	50% OD	n.d.	18 x10 ⁶	Sondergaard, 1996
BTA 3L (Applikon)	Sf9	Sf-900 II	250-400rpm Aspersão 20mL/min Esp. Vazio 200mL/min	50% OD pH 6,3	t_D 22-46	3,0- 10,0x10 ⁶	Mitchell-Logean e Murhammer, 1997
BTA 7; 15L (Applikon)	Sf9	Insect -Xpress	80rpm Aspersão 0,005 vvm	50% OD	n.d.	5,0x10 ⁶	Klaassen et al., 1999
BTA 3,5L (Chemap) Bat. Alimentada	Sf9	Sf-900 II	Aspersão 10mL/min Esp. Vazio 290mL/min	40% OD	t_D 24	38x10 ⁶	Elias et al., 2000
BTA 10L	S2	HyQ SFX	90rpm	-	μ 0,72-0,96	3,0 x10 ⁷	Valle et al., 2001
BTA 3L (Applikon)	Sf9 T.ni	Sf-900II Express-Five SFM	150rpm Aeração esp. vazio	50% OD pH 6,2-6,3	n.d.	n.d.	Zhang et al., 2002
BTA 2L (Spinner)	Sf9	Sf-900 II	100rpm	1,3% OD 5% OD 25% OD 45% OD	n.d.	s/ cresc. 7,8 x10 ⁶ 5,9 x10 ⁶ 4,9 x10 ⁶	Gotoh et al., 2002
BTA 2L (Spinner)	Sf9	Sf-900 II	100rpm Aeração livre bolhas 11min ⁻¹	0-100% OD	n.d.	4,0 x10 ⁶	Gotoh et al., 2004
BTA 1,7L (Virtis Baffled) Bat. BTA 5L (Celligen) Bat. Alimentada	Sf9	TNM-FH	100rpm Aeração superficial 600mL/min	30% OD	n.d.	1,5 x10 ⁶ 2,0 x10 ⁶	Palomares, López e Ramirez, 2004

BTA – biorreator tanque agitado; OD – oxigênio dissolvido; SFB – soro fetal bovino.



Biorreator RWV

Biorreator HARV na posição de microgravidade (A) e na posição controle com gravidade normal (B). Quando totalmente preenchido de meio de cultura, para evitar a turbulência gerada pelo estouro de bolhas, e colocado de forma ao eixo ficar perpendicular a gravidade simula condições de microgravidade anulando o vetor da gravidade. Quando o biorreator é colocado na posição vertical (eixo de rotação paralelo a gravidade) a gravidade não é anulada.



Biorreator de Ondas

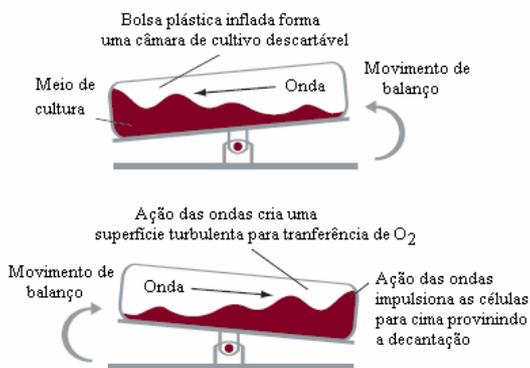


Figura 3.3. Exemplos de biorreatores utilizados no cultivo de células de inseto.

Na década de 1990, a NASA desenvolveu um sistema de cultura com parede rotatória (RWV- *rotating-wall vessel*), consistindo de um cilindro externo fixo e um cilindro interno que gira ao redor de um eixo horizontal e mantém a cultura em suspensão. Este tipo de biorreator é considerado como sendo de baixo cisalhamento e pode simular os ambientes de microgravidades encontrados no espaço (HARV, *high-aspect ratio vessel*) (IKONOMOU et al., 2003). Uma grande variedade de artigos é encontrada na literatura descrevendo o crescimento e morte de células Sf9 no biorreator HARV, um tipo de RWV (COWGER, O'CONNOR e BIVINS, 1997, 1999; FRANCIS, O'CONNOR e SPAUDING, 1997). O biorreator Couette-Taylor ou biorreator de vórtices é outro tipo de sistema de cultura rotatório. Ele consiste de dois cilindros axiais, onde o cilindro externo permanece parado e o fluido no espaço anular entre os dois cilindros é movimentado pela rotação do cilindro interno (WANG et al., 2005). O'Connor et al. (2002) realizaram o cultivo de células Sf9 em um biorreator Couette com um crescimento de $0,64 \text{ dia}^{-1}$ e uma concentração máxima de células de $6,1 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$. Devido às baixas tensões de cisalhamento a velocidade de morte por necrose foi 30 vezes menor que a velocidade de crescimento.

Outro protótipo de biorreator, utilizado para o cultivo de células sensíveis ao cisalhamento, é o biorreator de ondas (SINGH, 1999). Este sistema consiste de sacos de poliestireno pré-esterilizados e descartáveis colocados em uma plataforma agitada. Os sacos são preenchidos com meio e células e o resto da câmara é inflado com ar. A plataforma agitada gera ondas que asseguram a transferência de oxigênio, e uma boa distribuição de nutrientes e suspensão de células. Meio de cultura pode ser adicionado progressivamente até atingir o volume final do saco que podem variar de 0,1 até 500 L (IKONOMOU et al., 2003). Vale ressaltar também, que vem se tornando uma prática comum o uso de sacos de poliestireno para revestir reatores do tipo tanque agitado, pois além do saco ser descartável e estéril, não é necessário a esterilização do equipamento, o que reduz o tempo do processo.

Células Sf9 foram cultivadas em um biorreator de ondas de 20L em batelada alimentada. No final do processo a produção de proteínas por baculovírus em 2 dias foi comparável à produção em frascos agitados de 100 mL. Weber et al. (2001) também cultivaram células Sf9 neste sistema e obtiveram a mesma produção de um biorreator de tanque agitado com um custo 40 % inferior.

Pela Tabela 3.10. pode-se observar o grande número de trabalhos relacionados ao cultivo de células de inseto Sf9 e *T. ni* em biorreatores. O cultivo de células de *Drosophila sp.* em biorreatores, no entanto, ainda é pouco estudado. Um maior foco está sendo dado à modificação genética destas células para a produção de uma grande variedade de proteínas recombinantes. Os trabalhos disponíveis na literatura que realizaram o crescimento de células de *Drosophila* em biorreator encontram-se descritos abaixo.

Sondergaard (1996) realizou o cultivo da célula de *Drosophila* em biorreator com oxigenação realizada através de um tubo de silicone, agitação de 75 rpm e temperatura de $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ operando em três diferentes modos: batelada, semi-batelada (50-60% suspensão retirada e adicionado meio novo, processo repetido a cada 2-4 dias por 35 dias) e contínuo. Os sistemas em batelada e semi-batelada foram realizados com o meio de cultura Schneider's com 10% de soro fetal e o contínuo, realizado com meio livre de soro D-22. A maior concentração celular foi obtida no cultivo realizado em semi-batelada ($2,9 \times 10^{10}$ cel.L⁻¹), seguido dos cultivos de forma contínuo ($2,0 \times 10^{10}$ cel.L⁻¹) e batelada ($0,83 \times 10^{10}$ cel.L⁻¹).

Park et al. (1999) cultivaram células S2 em um biorreator HARV de 10 mL completamente preenchido com meio de cultura M3 a 10 rpm e 25°C. O crescimento celular e a produção de endostatina foram superiores em culturas em garrafas estáticas quando comparadas com as culturas em HARV. Valle et al. (2001) desenvolveram um processo para produção de “menin” humana em células S2 geneticamente modificadas através do cultivo em biorreatores de bancada. As células foram capazes de crescer até altas densidades, 2×10^7

cel.mL⁻¹, em batelada com aspersão de ar e oxigênio direto para o meio de cultura. Lim e Cha (2006) realizaram a modelagem matemática da produção de transferina humana em células S2 em frascos spinner de 500 mL e meio livre de soro M3. As células cresceram a uma velocidade de 0,0315 h⁻¹ e os autores atribuíram a limitação do crescimento às baixas concentrações de glicose.

3.7 Estratégias de cultivo para otimizar a produção de proteína recombinante

A instabilidade protéica é um problema comum no desenvolvimento, purificação, e armazenamento de produtos farmacêuticos recombinantes. Vários fatores são responsáveis por este fenômeno, como pH, temperatura, concentração de proteína, e forças hidrofóbicas que podem conduzir para a degradação, desnaturação e/ou agregação da proteína. A melhoria das condições de cultura é crucial para manter a atividade biológica e aumentar os rendimentos de produto. Células de mamífero são amplamente utilizadas para a produção de proteínas recombinantes provenientes de sistemas de expressão que tem habilidades para executar amplificação de gene e alta produtividade de produtos recombinantes (RODRIGUEZ et al., 2005).

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, RUAN e LAM, 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, PERRET e KAMEN, 1997; ELIAS et al., 2000).

Wang et al. (1993) determinaram que o rendimento específico de proteína recombinante em células Sf9 foi aumentado em 100% pela adição de glicose e glutamina (iguais aos níveis iniciais) a culturas em altas densidades, imediatamente após a infecção. Lee e Park (1994), adicionando extrato de levedura em cultura de células Sf9 na fase estacionária, estimularam o crescimento, aumentando a concentração final de células em até 3,5 vezes.

O cisalhamento é um tipo de estresse presente no ambiente de cultura da célula, no entanto, as células podem estar sujeitas a outros tipos de estresses em cultura, como, por exemplo, temperatura e mudanças na salinidade e alterações de pH devido a adição de ácido e base para controle do pH. As células são conhecidas por responder aos vários tipos de estresse através da indução de um grupo específico de proteínas freqüentemente denominado de proteínas “heatshock”, que são comumente referidas como sendo proteínas de estresse. Enquanto que os efeitos da temperatura na produção de proteínas têm sido vastamente investigados para um grande número de células e microrganismos, as conseqüências de outros tipos de estresses observados tipicamente em um cultivo em biorreator ainda não foram sistematicamente estudados. Embora a perda de viabilidade devido à hidrodinâmica dos biorreatores tenha sido freqüentemente estudada, como pode ser observado nos trabalhos descritos acima, ainda existem deficiências no conhecimento de como estes estresses mecânicos e também a deficiência de oxigênio afeta a produção de proteínas de estresse (HUHTALA, LINKO e MUTHARASAN, 2005).

A investigação da função das proteínas de estresse iniciou-se com a observação que a expressão deste tipo de proteínas estava relacionada com a indução da tolerância ao estresse. Quando células são submetidas diretamente às temperaturas extremas ou algum outro agente estressante, elas podem sofrer alguns danos e até mesmo morrer. Mas, se primeiramente as células forem submetidas a níveis de estresses sub-letais, elas poderão tornar-se tolerantes a níveis extremos de estresse. A tolerância induzida por um agente estressante pode proteger as

células dos demais agentes estressantes. Apesar da exata função das proteínas de estresse ainda não estar elucidada, é conhecido que muitas das funções das proteínas de estresse como chaperonas moleculares estão relacionadas a facilitação da tradução de polipeptídeos, transporte e enovelamento em condições normais e quando as células são submetidas a ambientes estressantes. Huhtala, Linko e Mutharasan (2005) estudaram os efeitos da exposição a ambientes estressantes frequentemente encontrados em biorreatores, incluindo choque térmico, exaustão de oxigênio, tensões de cisalhamento, mudanças no pH e salinidade e choque por etanol, na expressão de proteínas em células de inseto Sf9. A exposição das células a temperatura de 43°C por um período de 4 horas reduziu a viabilidade celular de 99% para 69%, alterou a morfologia celular e induziu a expressão de proteínas “heatshock” na fase de crescimento exponencial. Anoxia induzida por CO₂ por 24 horas, além de alterar o pH da cultura, ocasionou a deformação das células (encolhimento) e a expressão de uma proteína “heatshock” de 70 kDa. Anoxia induzida por N₂ também por um período de 24 horas não alterou a viabilidade e ocasionou uma menor deformação das células quando comparada à anoxia induzida por CO₂, sendo a produção de proteínas de estresse desprezível. A adição de 0,25-1,0% NaCl ao cultivo durante 2 horas não alterou a viabilidade e a expressão de proteínas. A adição de 1,5% de NaCl inibiu a síntese de proteínas pela célula. A exposição a diferentes concentrações de etanol (2-10%) apesar de diminuir a viabilidade e a síntese de proteínas não levou à indução da expressão de proteínas “heatshock”. Células submetidas a níveis de estresse laminar apresentaram uma perda de viabilidade, mas não induziram a expressão de proteínas de estresse. Alterações de pH de $\pm 0,2$ por curtos períodos de tempo não alteram o crescimento, viabilidade e indução de proteínas. Os autores concluíram que a viabilidade celular e a indução da expressão de proteínas de estresse não são eventos coordenados.

A influência apenas do oxigênio dissolvido (OD) no crescimento da célula de inseto ainda é desconhecida, apesar de vários trabalhos na literatura indicarem uma potencial significância na produtividade de proteínas recombinantes. O controle de OD no cultivo de células de inseto em biorreatores deve assegurar que o crescimento e a produção de proteínas não seja limitado, e que também o oxigênio não seja prejudicial à célula devido aos radicais livres gerados em altas concentrações. O controle do oxigênio dissolvido também pode contribuir para uma melhor produção de proteínas recombinantes através de sua proteção contra a atividade proteolítica (AGATHOS, 1996).

Algumas técnicas utilizadas em células de mamíferos com o objetivo de desenvolver um processo de cultivo de alta produtividade têm conseguido aumentos significativos de proteína recombinante, entre as quais podem-se destacar: a) cultivo das células em baixas temperaturas e b) adição de agentes que promovem o aumento da expressão da proteína de interesse como DMSO (dimetilsulfóxido), butirato de sódio, rapamicina, AMP (adenosina monofosfato) e glicerol (AL-FAGEEH et al., 2006; LI et al., 2006).

O glicerol tem sido reportado na literatura como um composto capaz de estabilizar as proteínas em sua conformação nativa, podendo também ser considerado como chaperonas (proteínas que atuam auxiliando o dobramento de muitas proteínas) químicas por sua influência no enovelamento das proteínas (YOSHIDA et al., 2002). Glicerol (1,2,3-propanotriol) tem sido utilizado extensivamente na indústria farmacêutica e bioquímica como um estabilizador de proteínas. Como um osmólito, o glicerol pode formar pontes de hidrogênio, auxiliando na formação de uma “concha” de solvente ao redor da molécula de proteína, bem como aumentar a tensão superficial e viscosidade da solução (FAGAIN, 1997). Na produção de β -interferon em células CHO, a adição de 1% de glicerol, apesar de resultar em uma diminuição do crescimento celular (provavelmente em função da diminuição da citocinese) e não aumentar a produção volumétrica e específica da proteína, diminuiu o nível

de agregação molecular, uma vez que no cultivo controle, após o processo de desnaturação, a concentração de β -IFN aumentou cerca de 10 vezes enquanto que no cultivo contendo glicerol, a concentração aumentou apenas 1,4 vezes (RODRIGUEZ et al., 2005).

O DMSO (dimetilsulfóxido) também é considerado um estabilizador de proteínas, atuando também como protetor através do princípio de chaperonas químicas. De acordo com Fiore e Degrassi (1999), o DMSO pode causar a entrada na fase de repouso G₀ do ciclo celular de células CHO, prevenir apoptose e promover um fenótipo diferenciado. Devido a sua natureza polar, o DMSO pode penetrar na membrana celular sem causar danos significativos (LIU et al., 2001).

A adição de DMSO também tem sido utilizada como estratégia para aumento da produção de proteínas recombinantes em células CHO. Na produção de β -Interferon observou-se o aumento de 2 vezes na produtividade específica, uma diminuição do crescimento, sem, no entanto, inibir a agregação molecular utilizando 1% de DMSO (RODRIGUEZ et al., 2005). De acordo com Li et al. (2006), a adição de 1,5% de DMSO, aumentou em 5 vezes a produtividade do antígeno de superfície da hepatite B, diminuiu o crescimento celular e suprimiu o metabolismo glicolítico. Os autores concluíram que o efeito positivo do DMSO na produção de proteínas recombinantes é devido a uma redistribuição do fluxo metabólico. No entanto, o mecanismo específico de atuação do DMSO ainda permanece sob investigação.

A temperatura também pode ser utilizada com um parâmetro de controle para otimizar a produtividade no cultivo de células. O efeito da temperatura na produção e no crescimento celular tem sido amplamente estudado como uma tentativa de aumentar a produtividade de proteína recombinante em células CHO (FOX et al., 2004; FURUKAWA e OHSUYE, 1998, 1999; HENDRICK et al., 2001; KAUFMANN et al., 1999). Incubações prolongadas de algumas proteínas a altas temperaturas podem causar desdobramento, instabilidade, e

agregação (SHARMA e KALONIA, 2003; BUMELIS et al., 2002). A estratégia de redução da temperatura de cultivo tem sido amplamente utilizada para a produção de produtos recombinantes provenientes de células de mamíferos (RÖSSLER, LÜBBEN e KRETZMER, 1996; MOORE et al., 1997). A diminuição da temperatura de cultivo é a estratégia mais utilizada para o aumento da produção de proteínas recombinantes, conforme pode ser observado na Tabela 3.11.

Tabela 3.11. Efeito da temperatura sub-fisiológica (<37°C) no cultivo de células de mamíferos na produção de proteínas recombinantes (adaptado de AL-FAGEEH et al., 2006).

Célula	Proteína recombinante	Temperatura (°C)	Alteração produção		Referência
			específica	volumétrica	
BHK-21	Antitrombina III	Várias	-	nenhuma	Weidemann et al., 1994
CHO	EPO	33	4x ↑	2,5x ↑	Yoon et al., 2003b
		30	5-6x ↑	2,5x ↑	
CHO	Anticorpo anti-4-1BB	33	1,2x ↑	nenhuma	Yoon et al., 2003a
		30	nenhuma	3,9x ↓	
CHO	SEAP	30	1,7 ↑	3,4 ↑	Kaufmann et al., 1999
CHO	Fab quimérico	28	-	14-38x ↑	Schatz et al., 2003
CHO	γ-Interferon	32	2x ↑	40-90% ↑	Fox et al., 2004
CHO	tPA	32	-	1,7x ↑	Hendrick et al., 2001
CHO	Anticorpos humanizados	32	-	4-25x ↑	Yoon et al., 2004
CHO	tPA	34	nenhuma	nenhuma	Clark et al., 2004
CHO	β-Interferon	30	-	4x ↑	Rodriguez et al., 2005

A resposta de células eucarióticas ao choque-térmico e os mecanismos biológicos que governam a resposta celular a temperaturas sub-fisiológicas ainda não estão bem entendidos. Estresse térmico expõe as células a dois principais estresses, aqueles relacionados às mudanças da temperatura no ambiente de cultivo e os relacionados às mudanças nas concentrações de oxigênio dissolvido em temperaturas reduzidas (OHSAKA et al., 2002). O que é claro é que a exposição das células a temperaturas sub-ótimas está relacionada a

respostas coordenadas que envolvem a modulação do ciclo celular, metabolismo, transcrição, tradução, e citoesqueleto (AL-FAGEEH et al., 2006). Temperaturas sub-fisiológicas podem induzir a expressão de mais de 20 genes em células de mamíferos (SONNA et al., 2002). O cultivo das células em temperaturas mais baixas resulta no aumento do tempo de geração, manutenção da viabilidade celular por períodos prolongados, redução do consumo de glicose e glutamina, diminuição da liberação de sub-produtos, atraso da apoptose, redução da atividade proteolítica e aumento da tolerância ao cisalhamento (YOON et al., 2003b).

De acordo com Kankanamge et al. (2003), o maior problema na produção da GPV em células animais transfectadas com o cDNA da proteína G é o defeito funcional na atividade fusional dependente de pH ácido (“acidic pH-dependent cell fusion activity”). Os autores encontraram uma redução na reatividade da GPV com o anticorpo específico para a análise (mAb# 1-30-44) e concluíram que esta situação ocorreu, não devido as condições impróprias de reação antígeno-anticorpo, mas devido a uma mudança conformacional na estrutura da proteína. Esta mudança pode ter ocorrido espontaneamente mesmo em condições de pH neutro ou devido à interação da GPV ou outros componentes internos do vírus, resultando na destruição ou ocultamento do sítio de reconhecimento do anticorpo (1-30-44).

3.8 Comentários sobre a revisão bibliográfica

Existe um grande número de pesquisas realizadas com células de inseto, porém no que diz respeito ao cultivo utilizando células de *Drosophila melanogaster* S2 poucos trabalhos constam na literatura. No referente à influência da temperatura no crescimento celular e na expressão de proteínas, a existência de dados ou informação na literatura é praticamente nula. Assim, o estudo da influência da temperatura no cultivo de células S2 com o propósito de intensificar a produção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV), torna o presente trabalho interessante em função de seu ineditismo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Célula de inseto: preservação e condições de cultivo

Foram utilizadas células de *Drosophila melanogaster*, Schneider 2 – S2 – (SCHNEIDER, 1972) transfectadas com os vetores pAcGPV e pCoHygro, para produção do antígeno de superfície do vírus da raiva, aqui denominada de S2AcGPV2K (YOKOMIZO et al., 2007), cedidas pelo Dr. Carlos Augusto Pereira, Instituto Butantan, Laboratório de Imunologia Viral. As células foram conservadas em nitrogênio líquido a -196°C, ativadas e multiplicadas a 28°C.

4.1.2 Meio de cultura

Para cultivo de células de *Drosophila melanogaster* foi utilizado meio Sf-900 II (GIBCO BRL) com adição de aminoácidos (1,944 g/L de Pro+ 1,35 g/L de Gln + 0,00672 g/L de Cys + 0,066 g/L de Ser (Sigma Aldrich Co.)).

A Tabela 4.1 apresenta a composição do meio de cultura Sf-900 II utilizado com relação a alguns componentes. Vale ressaltar que a composição apresentada é baseada nas análises realizadas em nossos laboratórios por Swiech (2007), e em artigos encontrados na literatura, uma vez que a composição deste meio não é fornecida pelo fabricante.

Tabela 4.1. Teor de alguns componentes do meio de cultura Sf900 II utilizado para o cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2.

Componentes	Meio Sf-900 II	
	Concentração (mg.L ⁻¹)	Referência
ALGUNS COMPONENTES		
Glicose	10000,0	Swiech, 2007
Sacarose	2000,0	Radford et al., 1997
Trealose	1000,0	Marques, 2005
Maltose	1260,0	Radford et al., 1997
	1200,0	Swiech, 2007
Extrato de levedura	4000,0	Schlaeger, 1996
AMINOÁCIDOS		
Alanina	360,0	Swiech, 2007
Arginina	330,0	Swiech, 2007
Asparagina	1100,0	Swiech, 2007
Cisteína	45,0	Swiech, 2007
Ácido glutâmico	1650,0	Swiech, 2007
Glutamina	2300,0	Swiech, 2007
Glicina	570,0	Swiech, 2007
Histidina	220,0	Swiech, 2007
Isoleucina	760,0	Swiech, 2007
Leucina	360,0	Swiech, 2007
Lisina	640,0	Swiech, 2007
Metionina	1000,0	Swiech, 2007
Fenilalanina	870,0	Swiech, 2007
Prolina	600,0	Swiech, 2007
Serina	310,0	Swiech, 2007
Treonina	350,0	Swiech, 2007
Tirosina	230,0	Swiech, 2007
Valina	620,0	Swiech, 2007

4.2 Procedimento experimental de um cultivo típico

O procedimento padrão para o cultivo das células S2AcGPV2K pode ser dividido em 3 etapas como mostrado na Figura 4.1.

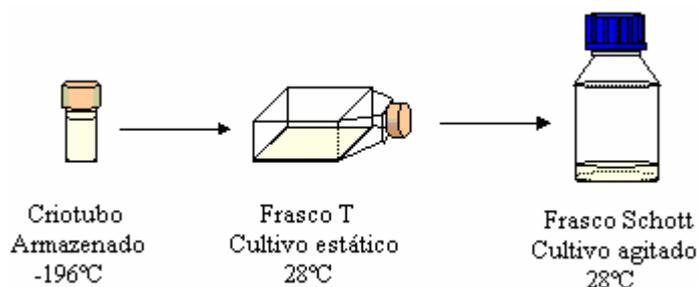


Figura 4.1. Representação esquemática do procedimento de cultura padrão de células S2AcGPV2K.

4.2.1 Preservação das células

As células foram preservadas em tubos de criogenia em nitrogênio líquido a -196°C . Para o congelamento, células foram retiradas de culturas na fase de crescimento exponencial e centrifugadas a 1600 rpm por 3 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram re-suspendidas em meio de congelamento (50% SFB, 40% Meio de cultura Sf-900 II e 10% DMSO) a uma densidade de $1 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ e congeladas primeiramente em ultrafreezer durante 24 horas em uma taxa de congelamento constante de -1°C por minuto promovida pela utilização de reservatório específico contendo álcool isopropílico, e então armazenadas em nitrogênio líquido.

4.2.2 Descongelamento de células e ativação

Para o descongelamento das células, o tubo de criogenia foi retirado do nitrogênio líquido e colocado em um banho termostático a 36°C para rápido descongelamento. A suspensão de células foi colocada em um tubo Falcon contendo 10mL de meio de cultura e centrifugada a 1000 rpm por 3 minutos. O meio de cultura foi em seguida descartado para remoção do DMSO (dimetilsulfóxido) e o pellet de células ressuspendido em 1 mL de meio de cultura novo e transferido para uma garrafa de cultura de 25 cm^2 contendo 4mL de meio de

cultura. As células foram mantidas na garrafa estática por 72 h a 28°C para adaptação das células e só então passadas para frascos Schott agitados.

4.2.3 Preparação de inóculo através do cultivo em frasco Schott

Visando obter maior reprodutibilidade dos resultados, foi padronizado um método para preparação das células que seriam utilizadas como inóculo. No início de um novo experimento, preparou-se um frasco Schott, nas mesmas condições do ensaio, para servir de inóculo. A concentração de inóculo foi de 5×10^5 cel.mL⁻¹. O meio de cultura foi aquecido em banho termostático a 28°C. Quando o cultivo atingia 72 horas, ou seja, quando as células estavam na metade da fase exponencial, iniciava-se o experimento com a inoculação de meio de cultura fresco utilizando um volume de suspensão celular adequado para atingir a mesma concentração inicial de células (5×10^5 células.mL⁻¹).

4.2.4 Estudos em pequena escala (frascos Schott)

O procedimento para o cultivo das células S2AcGPV2K em Schott pode ser dividido em 4 etapas como mostrado na Figura 4.2.

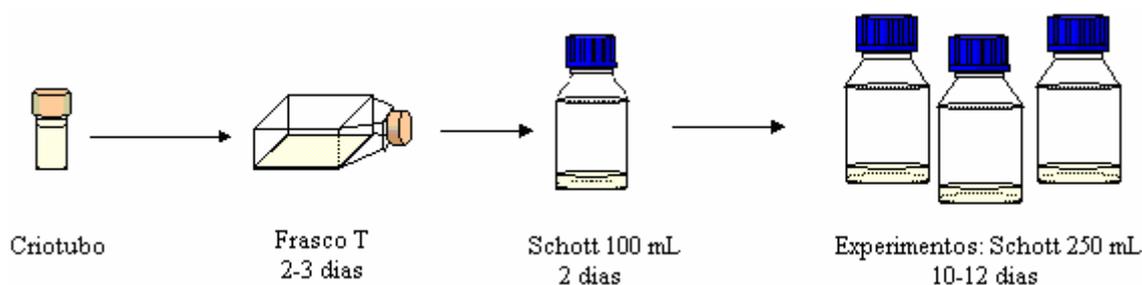


Figura 4.2. Representação esquemática do procedimento seguido para a realização de experimentos de cultura com células S2AcGPV2K em incubador rotatório (shaker) a 100 rpm.

As células que estavam estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C) foram ativadas em 5 mL de meio livre de soro, Sf-900 II (Gibco), em frascos T de 25 cm². O meio de cultura

(normalmente conservado em geladeira para evitar sua degradação) utilizado foi aquecido em banho termostático a 28°C antes do uso. As células no frasco T foram incubadas, de forma estática, à temperatura de 28°C por 2-3 dias para recuperar completamente suas atividades normais. A seguir, fazia-se a contagem de células e transferia-se a quantidade necessária para se ter uma concentração inicial de 5×10^5 cél.mL⁻¹ para um frasco Schott de 100 mL com 20 mL de trabalho para servir de inóculo dos experimentos. Este frasco era colocado em incubadora rotatória (shaker) à temperatura de 28°C e agitação de 100 rpm, a fim de que as células se adaptassem à agitação e atingissem a fase exponencial para então serem utilizadas como inóculo para o experimento. Após aproximadamente 48 horas, um volume de meio contendo a quantidade adequada de células foi utilizado para inocular o frasco Schott do experimento com uma densidade inicial de 5×10^5 cél.mL⁻¹. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com volume de trabalho de 30 mL em shaker a 100 rpm.

Foram retiradas amostras de 0,7 mL a cada doze horas de forma asséptica e, a seguir, foram feitas análises de densidade e viabilidade celular. Após a contagem das células, o restante da amostra foi centrifugada a 1000 rpm por dez minutos. Após a centrifugação foram separados o sobrenadante e o pellet. O sobrenadante foi congelado para posteriores análises dos nutrientes e metabólitos. Ao pellet, foi adicionado 0,7 mL de tampão de lavagem e conservação (PBS + sacarose a 320mM), sendo depois ressuscitado através de vigorosa aspensão com micropipeta. Uma nova contagem celular foi feita para poder coletar uma alíquota contendo 1×10^6 células que, a seguir, foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante, e o pellet sendo armazenado seco em ultrafreezer a -80°C, para posterior análise da GPV.

O objetivo desta etapa da pesquisa foi a realização de uma série de experimentos preliminares para determinação de condições ótimas de cultivo que resultassem em uma quantidade de produção de proteína recombinante satisfatória. Para tal fim, foram utilizados

sistemas de cultura que propiciassem a utilização de volumes de cultura reduzidos, em função do alto custo do meio de cultura Sf-900 II (cerca de R\$ 220,00/L).

As condições dos experimentos realizados em pequena escala (Schott) são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Experimentos realizados em pequena escala, em frasco Schott, para avaliar a expressão de GPV da célula S2AcGPV2K.

Experimentos	Objetivo	Descrição
Comparação dos meios de cultura		
Sc – Sf-900 II	Derminar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de GPV da célula S2AcGPV2K.	T=28°C, Meio Sf-900 II
Sc – Sf-900 II + a.a.	Derminar meio de cultura mais adequado para uma melhor produção de GPV pela célula S2AcGPV2K.	T=28°C, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,066 g.L ⁻¹ Ser + 1,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,00672 g.L ⁻¹ Cys
Otimização das condições de cultivo		
Sc – T=16°C	Avaliação da produção de GPV pela célula S2AcGPV2K com a redução da temperatura de crescimento para 16°C	T=16°C, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,066 g.L ⁻¹ Ser + 1,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,00672 g.L ⁻¹ Cys
Sc – T=20°C	Avaliação da produção de GPV pela célula S2AcGPV2K com a redução da temperatura de crescimento para 20°C	T=20°C, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,066 g.L ⁻¹ Ser + 1,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,00672 g.L ⁻¹ Cys
Sc – T=24°C	Avaliação da produção de GPV pela célula S2AcGPV2K com a redução da temperatura de crescimento para 24°C	T=24°C, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,066 g.L ⁻¹ Ser + 1,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,00672 g.L ⁻¹ Cys
Sc – T=28°C	Avaliação da produção de GPV pela célula S2AcGPV2K com temperatura de crescimento de 28°C	T=28°C, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,066 g.L ⁻¹ Ser + 1,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,00672 g.L ⁻¹ Cys
Sc – T=34°C	Avaliação da produção de GPV pela célula S2AcGPV2K com o aumento da temperatura de crescimento para 34°C	T=34°C, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,066 g.L ⁻¹ Ser + 1,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,00672 g.L ⁻¹ Cys

Sc=frasco Schott. Dados comuns aos experimentos: Volume do frasco Schott de 250 mL, Volume de trabalho de 30 mL, pH=6,2, Agitação orbital 100 rpm, Batelada.

Os experimentos foram realizados com o meio de cultivo Sf-900 II puro e com a adição de aminoácidos, com o objetivo de identificar os substratos limitantes para o crescimento da célula S2AcGPV2K. Foram adicionados aminoácidos que até então estavam se apresentando como os mais consumidos pela célula. A adição foi de 1,944 g/L de prolina, 0,066 g/L de serina, 1,35 g/L de glutamina e 0,00672 g/L de cisteína.

Uma vez definido o meio de cultura, foram feitos estudos da influência de cinco temperaturas de cultivo (16, 20, 24, 28 e 34°C) visando uma ótima produtividade de proteína recombinante GPV. Com os resultados obtidos foram determinados parâmetros cinéticos

assim como os coeficientes de rendimento e produtividade para avaliar o desempenho das células no processo.

4.2.5 Cultivo em biorreator Bioflo 110

Após o conhecimento do comportamento das células S2AcGPV2K em cultura adquirido anteriormente, na etapa de cultivo em Schott, realizou-se a determinação da cinética de crescimento celular e produção da glicoproteína do vírus da raiva em biorreator.

Com o objetivo de verificar as condições ótimas de cultivo determinadas em frascos Schott para aumentar a produção de GPV, foram realizados ensaios em biorreator Bioflo 110 (New Brunswick Scientific, NJ, USA) com o controle das condições de cultivo. Utilizou-se um biorreator de 2L, com volume mínimo de trabalho de 850 mL, equipado com eletrodos de pH e oxigênio dissolvido (Mettler Toledo); agitação por hélice marinha (3 pás); controle de pH através da adição de NaOH 0,5M e H₂SO₄ 8% v/v, de acordo com a recomendação do fabricante para o cultivo de células de inseto; controle do oxigênio dissolvido através da mistura de gases (ar, O₂, N₂); para o experimento a 28°C o controle da temperatura foi realizado através da base aquecida do biorreator juntamente com uma linha de água com vazão controlada por uma válvula peristáltica presente no sistema de controle do biorreator. Para os experimentos em outras temperaturas, o controle de temperatura foi realizado através de um banho termostático (modelo: RTE 211, Neslab instruments inc). As condições de cultivo padrão dos experimentos foram: pH 6,20, oxigênio dissolvido 50%, agitação de 150 rpm e temperatura variável conforme o experimento. Para a realização dos experimentos, optou-se pela adaptação do sistema de aeração por membrana de silicone (comprimento da mangueira é de 7,84m e diâmetro interno de 1,6 mm).

A Figura 4.3 mostra o biorreator Bioflo 110 e o sistema de aeração por membrana de silicone utilizado nesta etapa do trabalho. O procedimento para preparo de cada experimento encontra-se ilustrado na Figura 4.4.

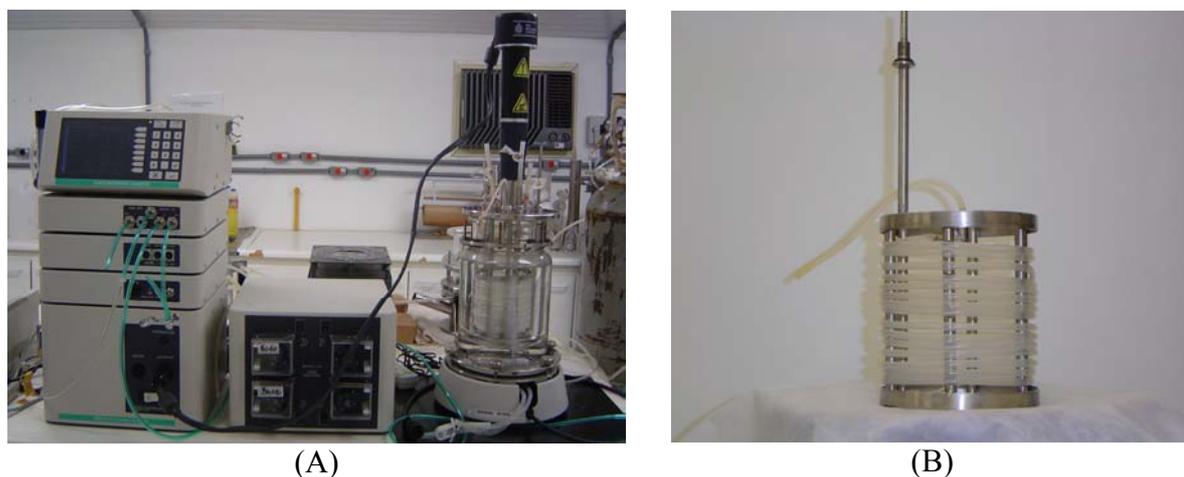


Figura 4.3. Biorreator Bioflo 110 utilizado nos cultivos de célula S2AcGPV2K (A) e seu sistema de oxigenação por membrana de silicone (B).

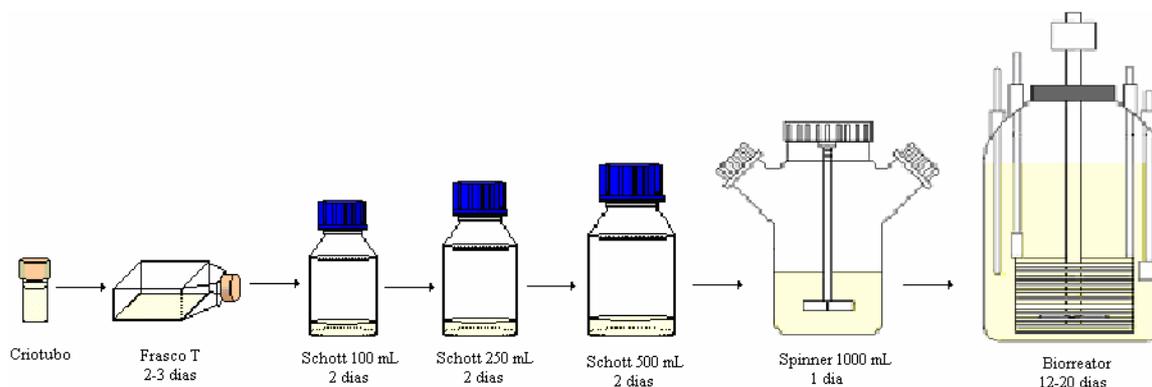


Figura 4.4. Representação esquemática do procedimento de cultura da célula S2AcGPV2K para a realização dos experimentos em biorreator Bioflo 110.

Após o descongelamento do criotubo, as células foram mantidas estáticas de 2 a 3 dias em frascos T de 25 cm², passadas para Schott de 100mL (Vt=20mL), após 2 dias as células foram passadas para Schott de 250mL (Vt=50mL), depois para Schott de 500mL (Vt=100mL), e posteriormente o inóculo foi preparado em frascos spinner de 1L (Vt=200 mL), com densidade inicial de $2,0 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, para a adaptação das células a um ambiente

de cultivo com um perfil de agitação semelhante ao do biorreator. O biorreator foi inoculado quando as células encontrava-se na metade da fase de crescimento exponencial (aproximadamente $5,0 \times 10^6$ cel.mL⁻¹).

A Tabela 4.3 apresenta as condições empregadas nos experimentos realizados em biorreator, seus objetivos e as respectivas condições de cultivo.

Tabela 4.3. Experimentos realizados em biorreator Bioflo 110 para avaliar a expressão de GPV da célula S2AcGPV2K.

Experimentos	Objetivo	Descrição
Bio-1	Avaliação da produção de GPV da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com prolina, serina, glutamina e cisteína	Vt=1.000mL, T=28°C, Batelada, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,066 g.L ⁻¹ Ser + 1,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,00672 g.L ⁻¹ Cys
Bio-2	Avaliação da produção de GPV da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com prolina, serina, glutamina, cisteína e asparagina, com a redução da temperatura de crescimento para 20°C	Vt=1.000mL, T=20°C, Batelada, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,132 g.L ⁻¹ Ser + 2,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,0134 g.L ⁻¹ Cys + 0,066 g.L ⁻¹ Asn
Bio-3	Avaliação da produção de GPV da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com prolina, serina, glutamina, cisteína e asparagina, com a redução da temperatura de crescimento decrescente de 20°C para 16°C	Vt=1.000mL, T=20-16°C Batelada, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,132 g.L ⁻¹ Ser + 2,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,0134 g.L ⁻¹ Cys + 0,066 g.L ⁻¹ Asn
Bio-4	Avaliação da produção de GPV da célula S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com prolina, serina, glutamina, cisteína e asparagina, com a redução da temperatura de crescimento para 20°C, em batelada alimentada	Vt=850mL, T=20°C, F=3mL.h ⁻¹ , Batelada Alimentada, Meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L ⁻¹ Pro + 0,132 g.L ⁻¹ Ser + 2,35 g.L ⁻¹ Gln + 0,0134 g.L ⁻¹ Cys + 0,066 g.L ⁻¹ Asn Meio de alimentação: Sf-900 II + 7,4 g.L ⁻¹ Ser + 0,86 g.L ⁻¹ Cys

Vt=volume de trabalho. Dados comuns nos experimentos: Agitação 150 rpm, controle de pH 6,20, OD = 50% e Aeração por mangueira de silicone.

Devido ao esgotamento em diversas fases do crescimento celular dos aminoácidos serina, glutamina, cisteína e asparagina, observado no experimento a 20°C realizado em Schott (shaker), optou-se por acrescentar maiores concentrações dos mesmos, além das concentrações adicionadas no meio de cultura em experimentos em biorreator.

A Figura 4.5 mostra o procedimento a ser seguido após as amostragens no cultivo e na preparação da amostra para posterior análise de GPV, nutrientes e metabólitos.

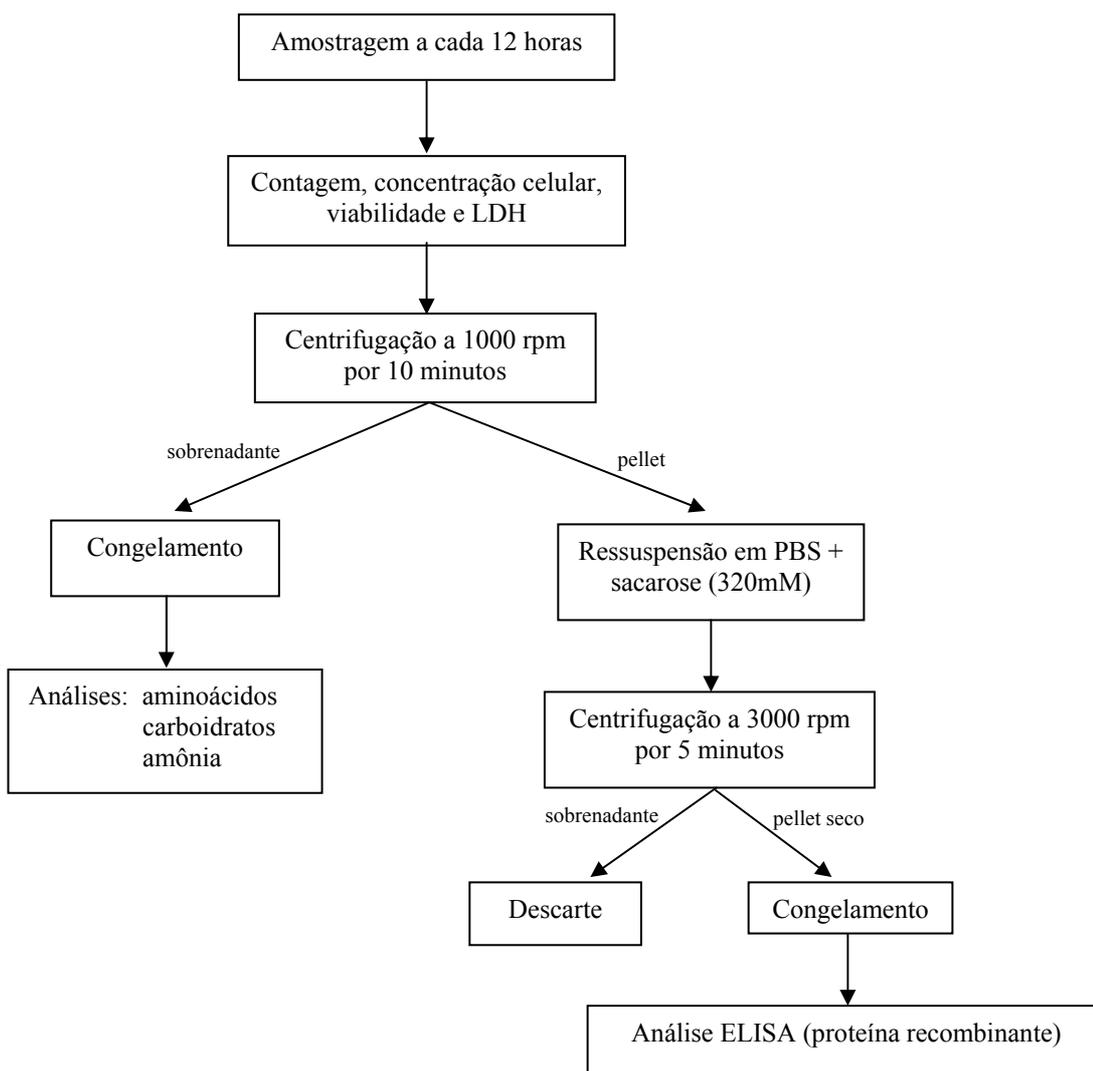


Figura 4.5. Esquema de procedimento a ser seguido após a retirada da amostra do biorreator Bioflo 110 em cada cultivo da célula S2AcGPV2K.

Foram retiradas amostras de 10 mL a cada doze horas assepticamente e realizadas análises de densidade e viabilidade celular. Após a contagem das células, o restante da amostra foi colocado em um tubo de centrífuga de 15 mL e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, procedeu-se à separação do sobrenadante do pellet. O sobrenadante foi congelado para posteriores análises dos nutrientes e metabólitos. Ao pellet, foi adicionado 10 mL de tampão de lavagem e conservação (PBS + sacarose (320mM)), sendo, a seguir, re-suspendido por aspensão vigorosa com micropipeta. Nova contagem celular foi realizada, seguida da coleta de uma alíquota contendo 1×10^6 células, que foi

centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante, sendo o pellet armazenado seco em ultrafreezer a -80°C para posterior análise da GPV.

4.3 Métodos analíticos

Os principais métodos analíticos utilizados nos experimentos realizados foram os seguintes:

4.3.1 Análise de densidade e viabilidade celular

Para a análise de viabilidade e densidade de células foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan em hemacitômetro (DOYLE & GRIFFITHS, 1998). Foram contados 16 quadrantes (8 quadrantes/câmara) com cerca de 50-100 células em cada um, para diminuir os erros de contagem. A média e o desvio padrão das medidas de densidade e viabilidade celular foram determinados considerando 4 eventos de contagem, sendo cada evento representado pela contagem de 4 quadrantes.

Na análise de densidade celular foram retiradas alíquotas de 90 μ L do recipiente em questão, em seguida foram acrescentados 10 μ L de uma solução etélica 0,04% azul de Tripan (Trypan Blue, Sigma T-6146) preparado anteriormente. Quando necessário, a amostra foi diluída em tampão PBS (Gibco, NY) de forma a se obterem em torno de 100 a 120 células por quadrante. Com ajuda de uma micropipeta inseriu-se uma alíquota de 10 μ L da amostra corada numa câmara de Neubauer, previamente preparada antes de acrescentar o corante na amostra, pois a viabilidade é afetada na presença prolongada no corante. A contagem foi realizada em microscópio OLYMPUS CK30, utilizando a objetiva de 10x.

As células que se apresentam não coradas são classificadas como células viáveis. Já as células que se apresentam coradas são classificadas como células não viáveis.

A densidade celular total é dada pelo somatório do número de células não coradas (viáveis) mais o número de células coradas (não viáveis), multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de Neubauer, como mostra a equação 4.1.

$$(n_v + n_d) \times FD \times V_c = X_{\text{Células totais} \times \text{mL}^{-1}} \quad (4.1)$$

A densidade de células viáveis é dada pelo número de células viáveis, multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de Neubauer, de acordo com a equação 4.2.

$$n_v \times FD \times V_c = X_{\text{Células viáveis} \times \text{mL}^{-1}} \quad (4.2)$$

Já a viabilidade celular é dada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células total no meio (células viáveis e inviáveis), multiplicados por 100, como mostrado na equação 4.3.

$$\frac{n_v}{n_v + n_d} \times 100 = \%_{\text{Células viáveis}} \quad (4.3)$$

onde n_v é o número total de células viáveis, n_d é o número total de células inviáveis, X é a densidade celular, V_c é o volume de um quadrante da câmara de Neubauer e FD é o fator de diluição para células de inseto. O volume de um quadrante da câmara de contagem é de 10^{-4} mL.

4.3.2 Análise de morte celular

Para a análise de morte celular foi utilizado o método da quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada para o meio de cultura, utilizando para tal o kit enzimático Tox-7 (Sigma Aldrich Co.). O método da lactato desidrogenase é um meio de

medir o número de células tanto pela lactato desidrogenase citoplasmática total (LDH) quanto pela integridade da membrana, como uma função da quantidade de LDH citoplasmática liberado no meio. A quantidade de células mortas pode ser quantificada pela quantidade de LDH liberada no sobrenadante. O método da lactato desidrogenase é simples, exato e com resultados reprodutíveis (LEGRAND et al., 1992). O método é baseado na redução do NAD^+ pelo LDH a NADH. O NADH então é utilizado na conversão estequiométrica do corante tetrazólio formando um derivado de formazan vermelho. O composto colorido resultante é medido por espectrofotometria. Se alíquotas do meio de cultura sem células são medidas, então a quantidade de LDH pode ser usada como um indicador da quantidade de células mortas, ou seja, da viabilidade real do cultivo.

Primeiramente retirou-se uma alíquota do meio de cultivo, centrifugou-se a 1000 rpm por aproximadamente 3 minutos, separando o sobrenadante do pellet. Retirou-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante e acrescentou-se 0,25 mL de solução do kit previamente preparada para que se iniciasse a reação. A amostra permaneceu em temperatura ambiente e coberta por papel alumínio para proteger da luz. Após 25 minutos, adicionou-se 75 μL de solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M para interromper a reação e então mediu-se a absorbância pelo espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro (UV/Visible spectrophotometer) em múltiplos comprimentos de onda, a 490 nm e 690 nm, onde a absorbância utilizada foi a diferença entre as absorbâncias obtidas nesses dois comprimentos de onda, conforme recomendado pelo fabricante do kit para análise de LDH utilizado. A densidade de células mortas foi calculada a partir da relação entre a absorbância e a densidade celular determinada através de uma curva padrão de várias densidades celulares lisadas com 1% v/v de Triton. Esta relação foi aproximadamente constante em todos os experimentos variando de acordo com a expressão, abaixo:

$$X_{LDH} = 2,36 \times 10^6 \times Abs \quad (4.4)$$

onde: X_{LDH} = densidade de células mortas determinada por LDH, cel.mL⁻¹

Abs = valor da absorbância medida da amostra.

4.3.3 Análise de substratos e metabólitos

Para análise de carboidratos utilizou-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com coluna de resina Aminex HPX-87H (Bio-rad), fase móvel H₂SO₄ 5mM, temperatura de 65°C e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ em cromatógrafo Waters com detecção através do índice de refração (W410, Waters) para carboidratos e UV 210nm para ácido láctico. A concentração de aminoácidos foi determinada também em HPLC, pelo sistema Pico-tag utilizando coluna de fase reversa (Waters), detecção por UV 254 nm, de acordo com Cohen et al. (1989). A análise da concentração de amônio foi feita através de um eletrodo seletivo, modelo ORION 710A (Thermo scientific) .

4.3.4 Análise de produto

A análise da glicoproteína da raiva (GPV) foi realizada no Instituto Butantan, em São Paulo, pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizando antígenos e anticorpos específicos para esta análise. Na a análise de GPV, retirou-se o pellet de células do ultrafreezer e aguardou-se por aproximadamente 5 minutos ou até que descongelasse. Ressuspendeu-o com 0,5 mL de Tampão A (4°C) (25 mM de Tris (pH 7,4), 25 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂ e H₂O), agitou-se em vórtex até a desagregação total do aglomerado. Acrescentou-se 0,5 mL de Tampão A + Nonitex (2X) (99,6 mL de Tampão A e 0,4 g de

Nonidet P-40) e agitou-se novamente em vórtex. Incubou-se a amostra na geladeira ou em banho de gelo durante uma hora. Neste período submeteu-se a amostra ao vórtex (cerca de 10 segundos) a cada 15 minutos. Ao final da incubação, centrifugou-se a amostra a 10000 rpm (10625g) durante 10 minutos para remoção de debris celulares. Utilizou-se apenas o sobrenadante na análise de ELISA, o método pelo qual tem como princípio a imunocaptura. A placa de poços utilizada no ensaio é sensibilizada com anticorpo policlonal purificado anti-glicoproteína da raiva. A glicoproteína da raiva, uma vez presente na amostra se liga a estes anticorpos, os quais são subseqüentemente ligados com anti-glicoproteína da raiva marcada com peroxidase, enzima que é capaz de catalisar a produção de um composto colorido quantificável por espectrofotometria. A comparação da absorbância medida para a amostra testada com a absorbância das diluições do antígeno de referência permite a determinação da concentração da glicoproteína na amostra, como descrito por Astray et al. (2008).

4.4 Tratamento dos resultados

Como parâmetros de avaliação do desempenho da célula S2AcGPV2K nos diferentes experimentos realizados foram utilizados como parâmetros de crescimento: a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), a densidade máxima de células (X_{\max}) e a produtividade máxima de células (P^X_{\max}), e como parâmetros de produção de GPV: a concentração volumétrica máxima de GPV (C^{GPV}_{\max}), a produtividade específica média de GPV referida a 10^6 células (\bar{q}_{GPV}), o rendimento de GPV em função do número de células ($Y_{\text{GPV}/X}$) e a produtividade máxima de GPV (P^{GPV}_{\max}). Neste trabalho foram utilizados o software Origin 7.0 e Microsoft Excel 2003 para tratamento dos resultados e preparação dos gráficos e cálculos, como será mostrado no capítulo de Resultados e Discussões.

Para a determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular, foi utilizado a equação do balanço de massa para as células em cultivo em batelada e batelada-alimentada, representado pela equação 4.5.

Batelada	Batelada-alimentada	
$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$	$\frac{dX}{dt} = (\mu - \bar{D}) \cdot X$	(4.5)

onde: μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});

X : densidade celular (cel.mL^{-1});

t : tempo (h);

\bar{D} : taxa de diluição média do cultivo em batelada alimentada ($\bar{D} = F / \bar{V}$), (h^{-1});

F : vazão de alimentação (mL.h^{-1});

\bar{V} : volume médio do cultivo em batelada alimentada ($\bar{V} = \frac{1}{\Delta t} \int V(t) \cdot dt$), (mL).

Considerando a fase exponencial de crescimento da célula e integrando a equação 4.5 com limites de integração da densidade inicial de células X_0 a uma densidade X num intervalo de tempo t , tem-se:

Batelada	Batelada-alimentada	
$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\text{máx.}} \cdot t$	$\ln X = \ln X_0 + (\mu_{\text{máx.}} - \bar{D}) \cdot t$	(4.6)

Na expressão 4.6, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ é dado pelo coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo.

A produtividade de células de uma cultura é uma medida do número de células produzidas por volume de cultura por unidade de tempo. A produtividade máxima pode ser determinada através da equação 4.7 (WANG et al., 1979):

$$P_{\max}^X = \frac{X_f}{\frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln\left(\frac{X_f}{X_0}\right) + t_{lag}} \quad (4.7)$$

onde: P_{\max}^X : produtividade máxima celular ($\text{cel.mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$);

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

X_f e X_0 : densidade celular final e inicial, respectivamente, (cel.mL^{-1});

t_{lag} : tempo de duração da fase lag (h).

A melhor maneira de caracterizar o metabolismo celular é através de suas velocidades de consumo e produção de metabólitos, ambas referidas a uma quantidade padrão de células (10^6 células). Mais conhecidos como coeficientes metabólicos, estas variáveis facilitam a comparação de várias linhagens de células e de desempenho em diferentes condições de cultivo, além de identificar mudanças nos caminhos metabólicos em relação ao tempo e em resposta a alterações das condições de cultivo para um determinado experimento.

A velocidade de formação de subprodutos por 10^6 células viáveis, q_{sub} e a velocidade de consumo de substratos por 10^6 células viáveis, q_s , e o rendimento celular em função do consumo de substrato, Y_{XS} , foram determinadas de acordo com as equações 4.8, 4.9 e 4.10, respectivamente para experimentos em batelada e batelada-alimentada, na região de crescimento exponencial.

Batelada	Batelada-alimentada	
$q_{sp} = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{dSp}{dt}$	$q_{sp} = \frac{1}{X_V \cdot V} \left(-F \cdot Sp_a + \frac{dSp \cdot V}{dt} \right)$	(4.8)

$q_s = -\frac{1}{X_V} \cdot \frac{dS}{dt}$	$q_s = \frac{1}{X_V \cdot V} \left(-F \cdot S_a + \frac{dS_a \cdot V}{dt} \right)$	(4.9)
--	---	-------

$$Y_{XS} = \frac{\mu_{\max}}{q_S} \quad (4.10)$$

onde: X_v : densidade de células viáveis (cel.mL^{-1});

S_p e S : concentrações de subprodutos (amônia e alanina) e substratos (glutamina, serina, cisteína, prolina e glicose), respectivamente (g.L^{-1});

S_{p_a} e A_s : concentrações na linha de alimentação (g.L^{-1});

V : volume de meio de cultura no biorreator (mL);

F : vazão de alimentação (mL.h^{-1}).

Uma equação polinomial de grau 2 foi ajustada aos resultados de consumo de substratos e formação de subprodutos em função do tempo. Para o crescimento da célula foi utilizado um ajuste sigmoidal. Para o cálculo dos valores de q , as derivadas dS_{sub}/dt e $-dS/dt$, obtidas analiticamente foram divididas pelos valores pontuais correspondentes ao ajuste sigmoidal de X_v . O valor médio de q na região exponencial foi determinado de acordo com a equação 4.11.

$$\bar{q} = \frac{1}{\Delta t} \cdot \int_0^{t_f} q \cdot dt \quad (4.11)$$

A densidade de morte celular foi avaliada de forma qualitativa através da análise da quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio de cultura.

A produção de GPV nos experimentos foi avaliada em relação à produtividade específica de GPV referida a 10^6 células (q_{GPV} , $\text{ngGPV} \cdot 10^{-6} \text{cel.h}^{-1}$), ao rendimento de GPV em função do número de células ($Y_{\text{GPV}/X}$, $\text{ngGPV} \cdot 10^{-6} \text{cel}$) e à produtividade máxima, determinada pela divisão da variação da concentração máxima de GPV obtida pelo respectivo tempo de cultivo. Os valores de q_{GPV} e $Y_{\text{GPV}/X}$ foram determinados através das equações 4.12 e 4.13,

respectivamente, para batelada e batelada-alimentada, no período em que houve o aumento da concentração da proteína em função do tempo.

Batelada	Batelada-alimentada
$q_{GPV} = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{dGPV}{dt}$	$q_{GPV} = \frac{1}{X_V \cdot V} \left(-F \cdot GPV_a + \frac{dGPV \cdot V}{dt} \right) \quad (4.12)$

$Y_{GPV/X} = \frac{dGPV/dt}{dX_V/dt}$	$Y_{GPV/X} = \frac{d(GPV \cdot V)/dt}{d(X_V \cdot V)/dt} \quad (4.13)$
---------------------------------------	--

O valor de q_{GPV} foi determinado semelhantemente a q_{Sub} e q_S e $Y_{GPV/X}$ através da tangente do gráfico de concentração de GPV em função da densidade celular, na região de crescimento exponencial.

Para situar o cultivo de células S2 no cenário geral do cultivo de células eucarióticas e procarióticas, foi determinada uma relação que possibilita determinar a massa de células produzidas ao longo de um cultivo. Uma quantidade de 10^6 células produziu uma massa seca de 0,58 mg de células, sendo este, um valor aproximado e que pode variar com o estado da célula (SWIECH, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Devido ao fato da célula S2AcGPV2K ser pouco conhecida em termos de cultivo *in vitro*, desenvolveu-se uma série de experimentos iniciais com o objetivo de conhecer o desempenho dessa célula em diferentes condições de cultivo visando à otimização da produção de proteína recombinante (GPV). Primeiramente foi realizado um experimento com adição de aminoácidos ao meio de cultura, visando obter um meio adequado para o crescimento celular e correto processamento da proteína recombinante. Uma vez definido um meio de cultura apropriado, foram realizados experimentos com diferentes temperaturas de cultivo, para identificar a que propicia os maiores valores de produção de proteína. Após os cultivos em pequena escala terem proporcionado substancial conhecimento sobre a produção de GPV em diferentes temperaturas de cultivo, procurou-se reproduzir os melhores resultados em biorreator, com o objetivo de aumentar a produção de proteína. A seguir são descritos os principais resultados obtidos no desenvolvimento desse trabalho.

5.1 Estudos em pequena escala (frascos Schott)

Frascos de cultura do tipo Schott agitados em mesa incubadora rotativa, permitem condições de cultivo, até certo ponto, similares àquelas obtidas em biorreatores do tipo tanque-agitado, uma vez que em ambos os casos as células crescem em suspensão e a oxigenação do meio é feita mediante agitação mecânica, embora no caso dos frascos Schott não se utilizem impelidores. Desta forma, os frascos Schott desempenham um papel importante na transição da passagem de escala de frascos de cultura para a escala de biorreator de bancada, tendo como principal vantagem a utilização de aparelhagens mais

simples e menores volumes de cultivo, possibilitando, portanto, a redução considerável do custo da pesquisa.

Na etapa do trabalho com frascos Schott, objetivou-se a determinação de primeira aproximação de algumas condições de cultura ótimas para o aumento da produção de GPV por células S2AcGPV2K. As condições de cultivo otimizadas identificadas em frascos Schott foram levadas em consideração na definição dos experimentos de cultivo em escala de biorreator com 1 L de meio.

5.1.1 Otimização do meio de cultura para cultivo de células S2AcGPV2K

Devido à inexistência de um meio de cultura otimizado para o cultivo de células S2, optou-se neste trabalho por fazer uma análise comparativa entre o meio de cultura livre de soro Sf-900 II e o mesmo suplementado com aminoácidos. Estudos anteriores realizados por Swiech (2007) demonstraram que os aminoácidos prolina, serina, glutamina e cisteína foram os mais consumidos pela linhagem S2AcGPV, chegando em muitos casos à exaustão. Portanto, como forma de otimizar a produção de GPV, objetivou-se avaliar o desempenho da célula com a adição de uma maior quantidade desses aminoácidos ao meio de cultura inicial em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, agitados a 100 rpm em mesa incubadora rotatória (shaker) a 28°C. Os aminoácidos suplementados foram: 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,350 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina, essas quantidades adicionadas foram estipuladas a partir dos dados de consumo desses aminoácidos obtidos por Swiech (2007). Devido ao fato desses quatro aminoácidos terem sido os mais importantes no cultivo da célula S2AcGPV2K, o resultado dos demais aminoácidos, com exceção da asparagina e da alanina em alguns experimentos, não serão apresentados no presente trabalho.

Na Figura 5.1 pode ser observada a diferença no metabolismo de aminoácidos da célula S2AcGPV2K nos dois meios de cultura. Os aminoácidos mais consumidos nas duas culturas foram asparagina (resultado não mostrado), cisteína, serina e glutamina. A completa exaustão de asparagina e glutamina foi observada na cultura em meio Sf-900 II. O metabolismo dos aminoácidos foi semelhante nas duas culturas, o consumo dos aminoácidos asparagina, serina, glutamina, histidina e leucina (resultado não mostrado) foi superior no meio de cultura suplementado, enquanto que os outros aminoácidos foram mais consumidos no meio Sf-900 II puro. Alanina foi produzida em grandes quantidades nos dois meios, sendo mais produzida no meio suplementado com aminoácidos, onde se obteve uma concentração final de $3,8 \text{ g.L}^{-1}$ quando comparada ao cultivo com meio Sf-900 II puro que se obteve uma concentração final de $3,36 \text{ g.L}^{-1}$.

Analisando o consumo de aminoácidos nas duas culturas, a produção de alanina foi consideravelmente alta. De acordo com Bhatia et al. (1997), a produção de alanina é alta em culturas com elevadas concentrações iniciais de glicose, que é o caso das condições do presente trabalho devido à utilização do meio de cultura Sf-900 II, que contém cerca de 10 g.L^{-1} de glicose.

Os aminoácidos prolina, serina, glutamina e cisteína apresentaram concentrações no final do cultivo suplementado de $2,828 \text{ g.L}^{-1}$; $0,207 \text{ g.L}^{-1}$; $0,166 \text{ g.L}^{-1}$, $0,007 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, ocorrendo portanto um maior consumo desses aminoácidos, quando comparados ao cultivo com o meio Sf-900 II puro, o qual apresentou concentrações finais de $1,095 \text{ g.L}^{-1}$ de prolina, $0,162 \text{ g.L}^{-1}$ de serina, 0 g.L^{-1} de glutamina e $0,008 \text{ g.L}^{-1}$ de cisteína. Pela Figura 5.1, verificou-se que a adição destes aminoácidos não alterou significativamente o crescimento e a viabilidade das células. A produção de amônio foi semelhante e com altos valores nos dois experimentos, porém não afetou o crescimento e não causou morte celular

significativa, o que indica que essa célula está se tornando resistente à presença de amônio no meio.

Pode-se observar pelo metabolismo das duas células, em cultivos em frascos Schott, que a glicose não foi um substrato limitante do crescimento celular, uma vez que suas concentrações no final do experimento estavam ainda longe da exaustão. A limitação foi provavelmente proveniente da exaustão de oxigênio dissolvido nos dois experimentos, assim como observado por Silva (2006), e pela exaustão da glutamina no 7º dia de cultivo no experimento controle.

A Tabela 5.1 apresenta os parâmetros cinéticos de crescimento celular obtidos para os experimentos com e sem a adição de aminoácidos ao meio de cultura. A velocidade específica máxima de crescimento celular foi semelhante nos dois cultivos, no entanto, a adição de aminoácidos exerceu um efeito positivo na densidade máxima de células. Provavelmente não foi observada uma diferença significativa no crescimento para os experimentos realizados com e sem a suplementação com aminoácidos devido à limitação exercida pela exaustão de oxigênio dissolvido. Nota-se, porém, que a adição de aminoácidos aumentou a densidade máxima de células, indicando que o meio Sf-900 II ainda não está otimizado para as necessidades nutricionais da célula S2, uma vez que foi originalmente desenvolvido para a linhagem celular Sf9.

Tabela 5.1. Crescimento das células S2AcGPV2K com e sem a adição de 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,350 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina ao meio de cultura Sf-900 II. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, incubados em shaker a 28°C e 100 rpm.

Experimento	μ_{\max} (h ⁻¹)	R	P_{\max}^X (cel.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)
Controle	0,042 ± 0,002	0,997	0,15	24,80
Suplementação aa	0,048 ± 0,002	0,998	0,24	27,40

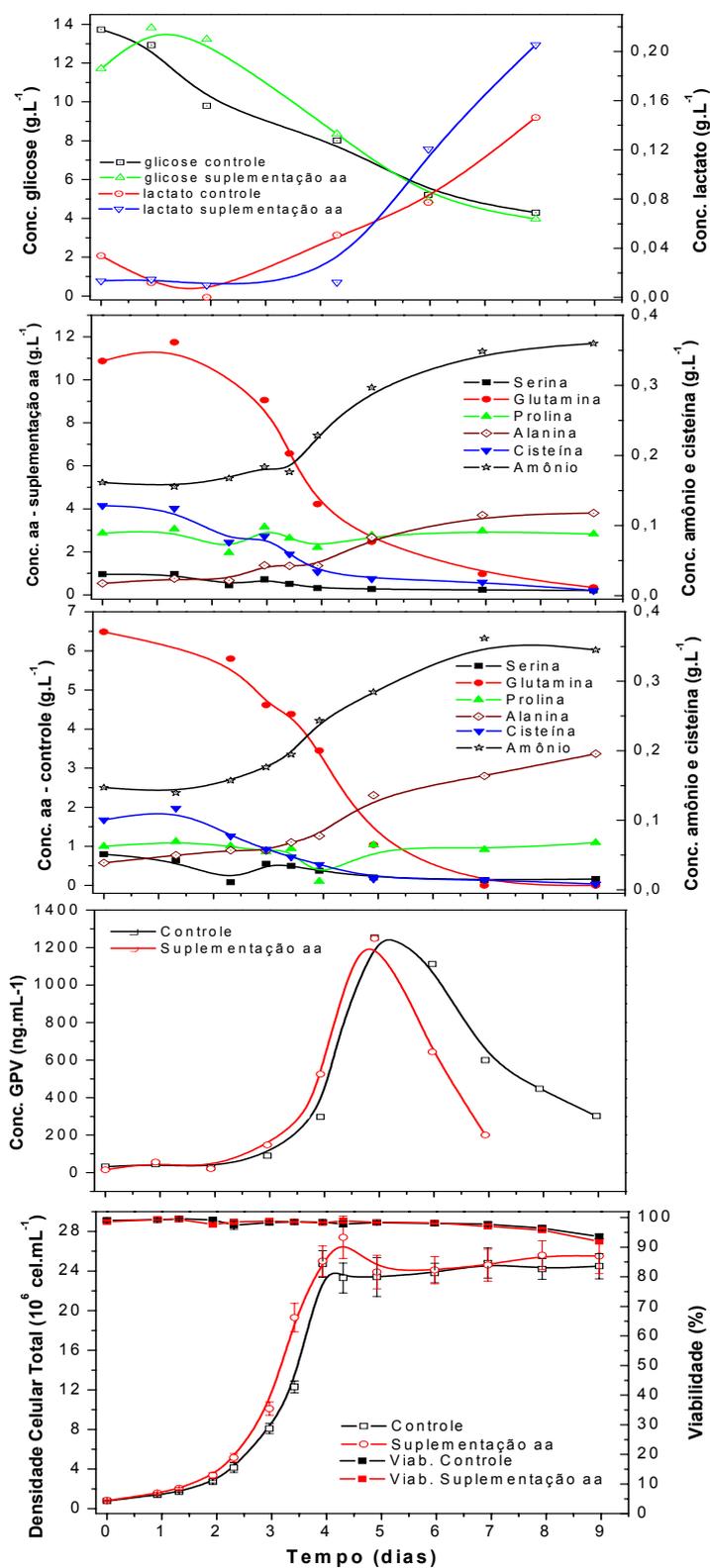


Figura 5.1. Resultados dos cultivos realizados com o meio Sf-900 II puro (controle) e suplementado com os aminoácidos prolina, serina, glutamina e cisteína para comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2, 28°C e 100 rpm.

A produção de GPV nos experimentos realizados pode também ser vista na Figura 5.1 e na Tabela 5.2. Os níveis de produção podem ser considerados baixos se comparados aos níveis de produção de proteínas recombinantes em células S2, conforme apresentado na Tabela 3.5, apresentada no capítulo referente à Revisão Bibliográfica. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura com níveis de expressão em células S2 semelhantes aos aqui obtidos, até 1000 ng.mL^{-1} , referente a proteína “*Drosophila* Chaoptin” (proteína de adesão celular) (KRANTZ e ZIPURSKY, 1990).

Tabela 5.2. Comparação da expressão de GPV das células S2AcGPV2K em experimentos com e sem a adição de aminoácidos no meio de cultura Sf-900 II, realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, incubados em shaker a 28°C e 100 rpm.

Experimento	$C_{\text{max}}^{\text{GPV}}$ (ng.mL^{-1})	\bar{q}_{GPV} ($\text{ng.10}^{-6}\text{cel.h}^{-1}$)	$Y_{\text{GPV/X}}$ ($\text{ng.10}^{-6}\text{cel}$)	$P_{\text{max}}^{\text{GPV}}$ ($\text{ng.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Controle	1253,21	0,41 *	11,28	10,62
Suplementação aa	1248,63	0,61 *	20,94	10,58

* valores válidos para $0 < t < 118 \text{ h}$.

Os experimentos com e sem suplementação de aminoácidos no meio de cultura apresentaram uma produção volumétrica e produtividade máxima de GPV semelhantes, contudo, o experimento com suplementação de aminoácidos apresentou uma maior produtividade específica média e um rendimento de GPV em relação ao número de células, aproximadamente duas vezes maior que o experimento controle. Porém, houve uma diminuição da produção volumétrica após o 5º dia de cultivo nos dois experimentos.

A instabilidade de proteínas é um problema comum no desenvolvimento, purificação e estocagem de produtos farmacêuticos recombinantes. Diversos fatores são responsáveis por este fenômeno, como, por exemplo: pH, temperatura, concentração de

proteínas, forças hidrofóbicas que podem levar à degradação de proteínas e/ou agregação (RODRIGUEZ et al., 2005) e ação de proteases. Um destes fatores, ou uma combinação dos mesmos, pode estar causando a diminuição acentuada da concentração de GPV.

Rodriguez et al. (2005) também reportaram uma diminuição da produção de uma glicoproteína (interferon- β) no cultivo de células CHO, pela análise por ELISA. No entanto, quando as amostras de proteína foram submetidas a um processo de desnaturação (adição de 10% SDS e 1 μ L de 2-mercaptoetanol sob fervura durante 3 minutos), a diminuição da concentração da glicoproteína não foi observada. Baseado neste comportamento, os autores concluíram que uma significativa quantidade da proteína estava presente em uma forma agregada de alto peso molecular. Portanto, a aparente diminuição da concentração determinada por ELISA pode ter ocorrido devido à agregação molecular que poderia ter blindado o sítio responsável pela detecção por ELISA. O processo de desnaturação das amostras provavelmente re-expôs os sítios necessários à detecção.

De forma geral, observou-se através da análise da literatura, que a expressão da glicoproteína rábica recombinante apresenta ainda uma série de dificuldades que vão desde os baixos níveis de produção até a expressão de proteínas com alterações conformacionais.

O fato de que a adição de aminoácidos aumentou a densidade máxima de células e não causou escassez dos aminoácidos no meio de cultivo, levou à escolha do meio de cultura Sf-900-II suplementado com aminoácidos para o desenvolvimento dos outros experimentos realizados neste trabalho, sendo uma estratégia viável, em escala industrial, somente até o 5º dia de cultivo.

5.1.2 Cultivo em diferentes temperaturas para otimizar a produção de GPV

Em função dos resultados observados na literatura para a produção de GPV relacionados aos baixos níveis de expressão, optou-se pelo estudo de estratégias que possibilitassem o aumento da produção e a diminuição de uma possível degradação e alteração conformacional da proteína. Foram realizados experimentos para avaliar a influência da temperatura de cultivo na fisiologia celular com o propósito de intensificar a produção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) em cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2 recombinante em meio de cultura Sf900-II suplementado com aminoácidos, em frascos Schott de 250 mL, com volume de trabalho de 30 mL, pH 6,2 e agitação de 100 rpm em mesa incubadora rotatória (shaker). Para tal foram avaliadas cinco temperaturas de cultivo: 16, 20, 24, 28 e 34°C. As alternativas que se mostraram mais eficientes foram também testadas em cultivos realizados em biorreator Bioflo 110.

Para esses experimentos não foram realizadas análises de carboidratos devido ao baixo volume de meio de cultivo, não possibilitando a retirada de um volume suficiente de amostra. Foram realizadas apenas análises de GPV, consumo de aminoácidos e produção de amônio.

5.1.2.1 Cultivo em temperatura de 16°C

Os resultados obtidos no crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K nos experimentos realizados a 28°C (controle) e 16°C estão apresentados na Figura 5.2.

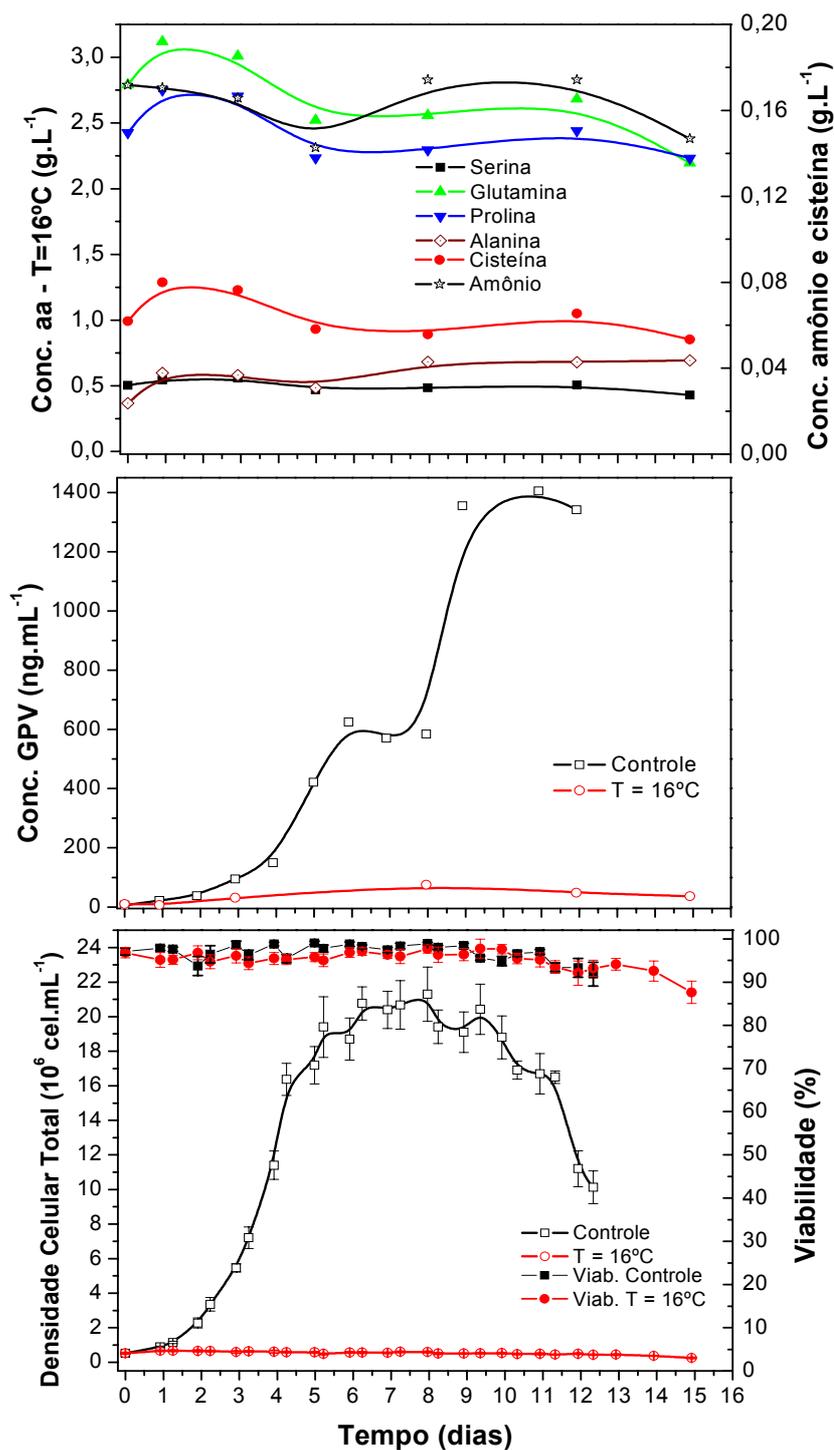


Figura 5.2. Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C e 16°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm.

Como se pode observar pela Figura 5.2, na temperatura de 16°C a célula S2AcGPV2K teve um leve crescimento nos primeiros dias de cultivo, passando em seguida a uma fase de decaimento até o final do cultivo. Isso pode ter ocorrido devido ao severo choque térmico ao

qual a célula foi repentinamente exposta ao ser passada de 28°C para 16°C. Acredita-se que esse período no qual a célula teve um decaimento no crescimento, seja um tempo maior de fase lag do cultivo, no qual a célula estava se adaptando a nova temperatura exposta, mas devido ao fato do cultivo ter sido realizado em frasco Schott e com um pequeno volume de trabalho (30 mL), não foi possível continuar por mais tempo o experimento para saber, com certeza, como as células reagiriam depois de um certo período. Possivelmente, depois de um período de adaptação em temperaturas mais baixas, como será mostrado em outros experimentos adiante, essa célula poderia vir a crescer. Os parâmetros cinéticos de crescimento e produção de GPV estão representados na Tabela 5.3.

Observou-se, contudo, que em temperatura tão baixa houve uma baixa produção GPV, com uma produção volumétrica máxima de 75,15 ng.mL⁻¹ quando comparada a de 1404,90 ng.mL⁻¹ obtida no experimento controle, sendo que a produtividade máxima também foi baixa, porém apresentou um rendimento de GPV em relação ao número de células de aproximadamente 8 vezes o rendimento obtido no experimento controle. Como não houve crescimento, conseqüentemente não houve consumo de substratos e produção de metabólitos.

Tabela 5.3. Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV das células S2AcGPV2K a 16°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,350 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Experimento	Crescimento		Produção de GPV			
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	C_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{\text{GPV/X}}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle (T=28°C)	0,036 ± 0,001 (R ² =0,999)	21,30	1404,90	0,62*	14,04	5,36
T = 16°C	0,009 ± 0,002 (R ² =0,978)	0,67	75,15	0,70**	116,59	0,40

* valores válidos para 0<t<214 h; ** valores válidos para 22<t<191h.

O cultivo a temperatura de 16°C não indicou ser uma boa estratégia para aumento da produção de proteína recombinante, pois mesmo obtendo-se um alto rendimento de GPV por célula, o número total de células é baixo, o que gera uma baixa produtividade. Isto acontece quando a célula é submetida desde o início do cultivo à temperatura de 16°C.

5.1.2.2 Cultivo em temperatura de 20°C

A Figura 5.3 representa a comparação entre o crescimento e produção de GPV a 20°C e 28°C e o metabolismo das células S2AcGPV2K a uma temperatura de cultivo de 20°C.

Com a redução da temperatura de cultivo 28°C para 20°C, diminuiu-se tanto o valor de μ_{\max} de 0,036 h⁻¹ para 0,020 h⁻¹, quanto a densidade máxima de células de 21,30.10⁶ cel.mL⁻¹ para 18,70.10⁶ cel.mL⁻¹, como pode ser observado na Tabela 5.4, mantendo-se a viabilidade celular alta por um período de tempo mais longo. A Tabela 5.4 mostra os parâmetros cinéticos de crescimento e produção de GPV obtidos durante o experimento a 20°C.

Tabela 5.4. Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV das células S2AcGPV2K a 20°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,350 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Experimento	Crescimento		Produção de GPV			
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	C_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{\text{GPV}/X}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle (T=28°C)	0,036 ± 0,001 (R ² =0,999)	21,30	1404,90	0,62*	14,04	5,36
T = 20°C	0,020 ± 0,001 (R ² =0,992)	18,70	2973,06	0,97**	32,64	8,30

* valores válidos para 0<t<214 h; ** valores válidos para 0<t<262,16 h.

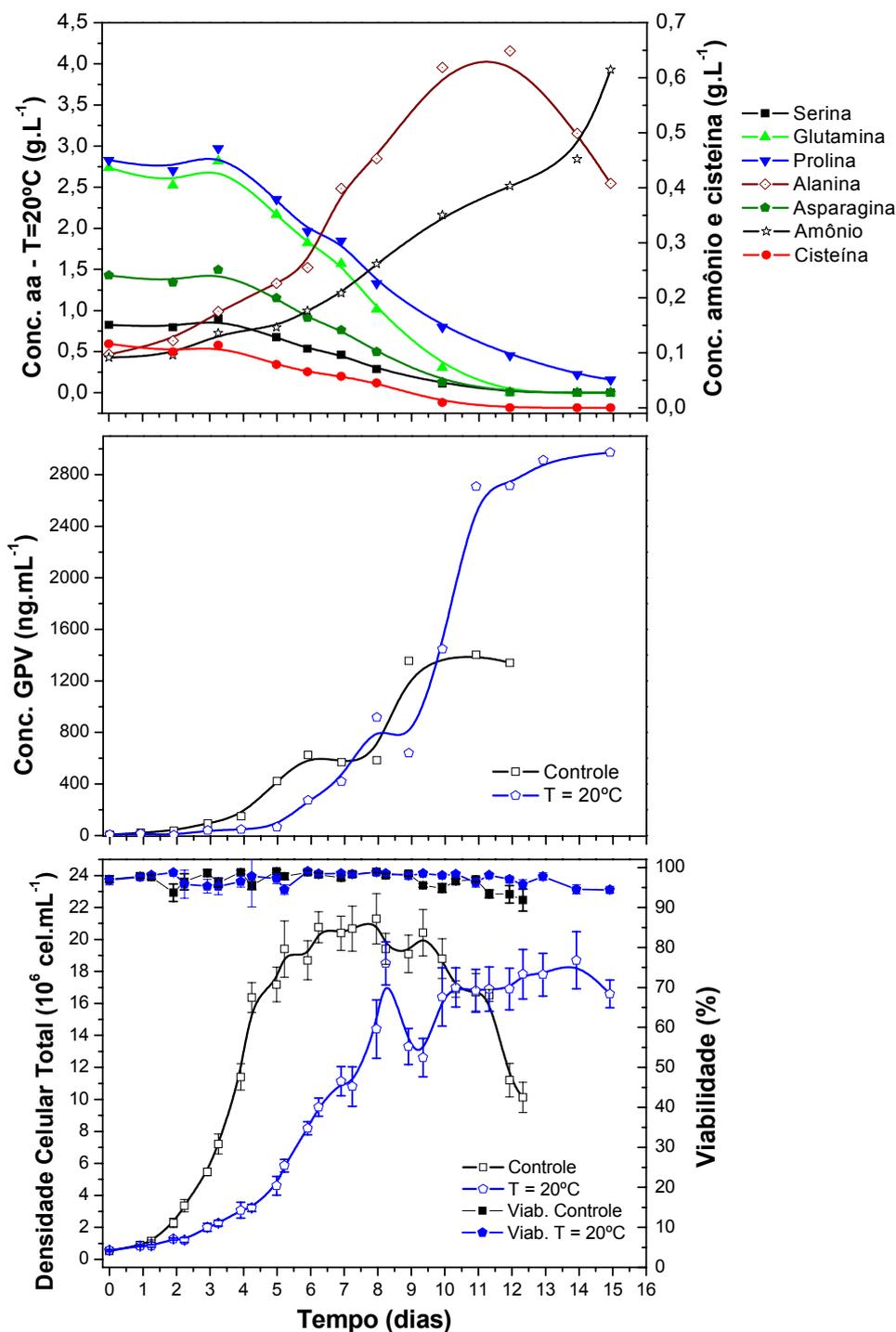


Figura 5.3. Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C e 20°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm.

Houve uma diminuição no crescimento celular a 20°C no 8º dia de cultivo e a partir do 9º dia a célula se recuperou e voltou a crescer. Acredita-se que isso tenha acontecido devido a uma queda de energia que ocorreu no laboratório, onde o shaker permaneceu parado por

algumas horas devido a problemas ocorridos na linha do gerador de energia. Essa queda de crescimento é coerente com a queda observada na produção de GPV.

A produção volumétrica de GPV e a produção específica média foi consideravelmente maior no experimento realizado a 20°C quando comparada ao experimento controle a 28°C, como pode ser observado na Tabela 5.4. No cultivo a 20°C houve também, um aumento significativo na produtividade máxima de GPV e um aumento de aproximadamente 2,3 vezes no rendimento de GPV por células. Esse foi o experimento que apresentou a maior produção e o maior rendimento de GPV, até então, obtida neste trabalho. Além disso, não se observou degradação e/ou agregação da proteína. Um aspecto interessante neste cultivo é o fato de que a maior velocidade de produção de GPV aconteceu entre os dias 9 e 11 do experimento. A única relação de causa e efeito plausível para este fenômeno é a baixa concentração de oxigênio dissolvido existente no Schott nessas circunstâncias. Considerando válida essa premissa, pode-se dizer que concentrações baixas de oxigênio dissolvido, ao redor de 10% da saturação com ar, podem ser mais favoráveis para a alta taxa de síntese de GPV.

Os substratos limitantes para o crescimento foram glutamina, serina, asparagina e cisteína. A glutamina e a cisteína se esgotaram no 12º dia de cultivo, enquanto que a serina e a asparagina acabam no 13º dia. Nesse experimento podemos notar uma desaceleração da produção de GPV no 12º dia, momento no qual se observou o esgotamento de cisteína, o amino ácido com mais baixa concentração no meio Sf-900 II e com uma função muito importante na estabilização de proteínas, uma vez que a cisteína é considerada como um componente chave, influenciando no metabolismo de outros aminoácidos (DOVERSKONG, HAN e HÄGGSTRÖM, 1998). Apesar das células terem atingido uma alta produção de GPV, é possível que se não houvesse exaustão de tais aminoácidos, a produção de proteína poderia continuar a aumentar. A produção de alanina foi consideravelmente alta, porém a

mesma passa a ser consumida após o esgotamento da glicose e da glutamina. Amônio foi produzido em grande quantidade, entretanto não afetou aparentemente o crescimento celular.

Estudos realizados por Drews et al. (2000) mostram que a glicose excedente no meio de cultura provoca a formação preferencial de alanina. Ao mesmo tempo, a formação deste metabólito é suprimida em virtude da completa escassez de glutamina do meio de cultura. A limitação de glutamina no meio de cultura força o consumo de aminoácidos como aspartato (fortemente consumido em culturas de Sf9 em batelada) seguido do glutamato e da asparagina. Na ausência de glutamina, os aminoácidos metionina e tirosina também podem ser consumidos pelas células Sf9 (MENDONÇA et al., 1999).

5.1.2.3 Cultivo em temperatura de 24°C

O efeito da redução da temperatura de cultivo de 28°C para 24°C no crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K em cultivo em frasco Schott pode ser observado na Figura 5.4.

A redução da temperatura de cultivo de 28°C para 24° teve um efeito positivo no crescimento celular, aumentando tanto o μ_{\max} (0,039 h⁻¹ para o experimento a 24°C e 0,036 h⁻¹ para o controle) quanto a densidade máxima de células (25,40.10⁶ cel.mL⁻¹ para o experimento a 24°C e 21,30.10⁶ cel.mL⁻¹ para o controle), onde não se observou um tempo de adaptação, ou fase lag no início do experimento, como foi observado em outros experimentos realizados em temperaturas abaixo de 28°C.

Esse foi o experimento em que se obteve a maior densidade máxima celular dos experimentos realizados em frascos Schott, chegando a 25,40.10⁶ cel.mL⁻¹, indicando ser, a 24°C, uma temperatura boa para crescimento celular, o que não é observado na literatura, a qual indica a temperatura de 28°C como sendo a temperatura ótima pra o crescimento das

células de *Drosophila melanogaster*. Este maior crescimento da célula de *Drosophila* na temperatura de 24°C é um fator importante a ser considerado na escolha de uma estratégia de cultivo para aumento de escala dessa célula.

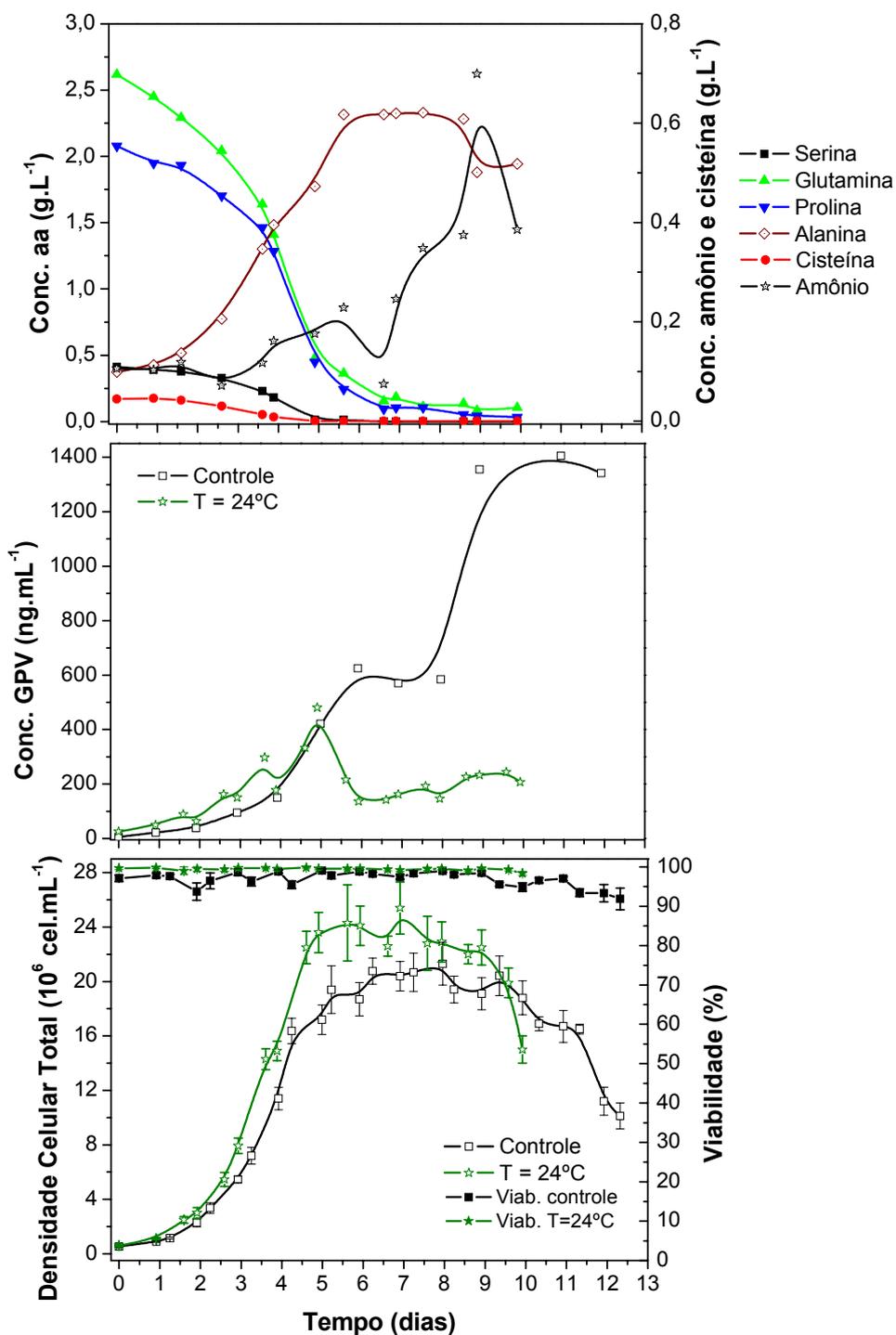


Figura 5.4. Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C e 24°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm.

Apesar do aumento na densidade celular, o cultivo a 24°C resultou em uma diminuição significativa na produção volumétrica e na produtividade máxima de GPV como pode ser observado na Tabela 5.5. Embora tenha ocorrido um aumento na produção específica média de GPV e no rendimento de GPV por células, quando comparado ao cultivo controle a 28°C, a redução de temperatura para 24°C não indicou ser uma boa estratégia para otimizar a produção de proteína, uma vez que sua concentração volumétrica está bem abaixo de outros experimentos observados nesse trabalho.

Tabela 5.5. Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV das células S2AcGPV2K a 24°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,350 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Experimento	Crescimento		Produção de GPV			
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	C_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{\text{GPV}/X}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle (T=28°C)	0,036 ± 0,001 (R ² =0,999)	21,30	1404,90	0,62*	14,04	5,36
T = 24°C	0,039 ± 0,001 (R ² =0,998)	25,40	480,34	0,75**	16,81	4,08

*valores válidos para 0<t<214 h; **valores válidos para 0<t<117,75 h.

A produção de GPV pode ter sido limitada pela escassez de glutamina, prolina, serina e cisteína no final do experimento, uma vez que a queda na produção ocorre quando há exaustão na concentração de cisteína, em torno do 5º dia do cultivo. Alanina foi produzida em grande quantidade, porém passou a ser consumida após baixas concentrações de prolina e glutamina, e possível esgotamento de glicose (dado não mostrado) no meio de cultivo, após o 9º dia de cultivo. Pode-se observar uma alta produção de amônio, chegando a uma concentração de 0,699 g.L⁻¹, contudo acredita-se que essa concentração não tenha afetado o

crescimento celular e nem influenciado na produção de proteína recombinante, porém não se descarta a hipótese da exaustão dos aminoácidos ter comprometido a produção de GPV.

Determinados estudos em relação ao acúmulo de amônia em cultura de células de inseto indicaram que esse acúmulo não atinge níveis tóxicos a menos que ocorra exaustão de glicose (BÉDARD, PERRET e KAMEN et al., 1997; ÖHMAN et al., 1996). Células Tn-5 podem acumular altos níveis de amônia no final da cultura, acima de 20 mM, e demonstram possuir um metabolismo semelhante ao de células de mamíferos (BENSLIMANE et al., 2005).

5.1.2.4 Cultivo em temperatura de 34°C

Depois de realizados os experimentos em temperaturas sub-fisiológicas, optou-se por testar uma temperatura mais alta do que a temperatura ótima de crescimento da célula de *Drosophila melanogaster* S2, com o objetivo de verificar o desempenho desta célula quanto ao crescimento e produção de GPV em temperaturas supra-fisiológicas. Para tal, realizou-se experimentos na temperatura de 34°C. Os resultados obtidos nesse experimento estão representados na Figura 5.5.

Como se pode observar pela Figura 5.5, a célula S2AcGPV2K teve um leve crescimento nos primeiros dias de cultivo, diminuindo a densidade celular a partir do 3º dia e seguindo assim até o final do cultivo. Isso pode ter ocorrido devido ao choque térmico ao qual a célula foi exposta.

Os parâmetros cinéticos de crescimento e produção de GPV estão representados na Tabela 5.6.

O aumento da temperatura de cultivo de 28°C para 34°C provocou uma diminuição no $\mu_{\text{máx}}$ de 0,036 h⁻¹ para 0,022 h⁻¹, reduzindo consideravelmente também a densidade máxima celular de 21,30.10⁶ cel.mL⁻¹ no experimento controle para 1,20 .10⁶ cel.mL⁻¹ a 34°C.

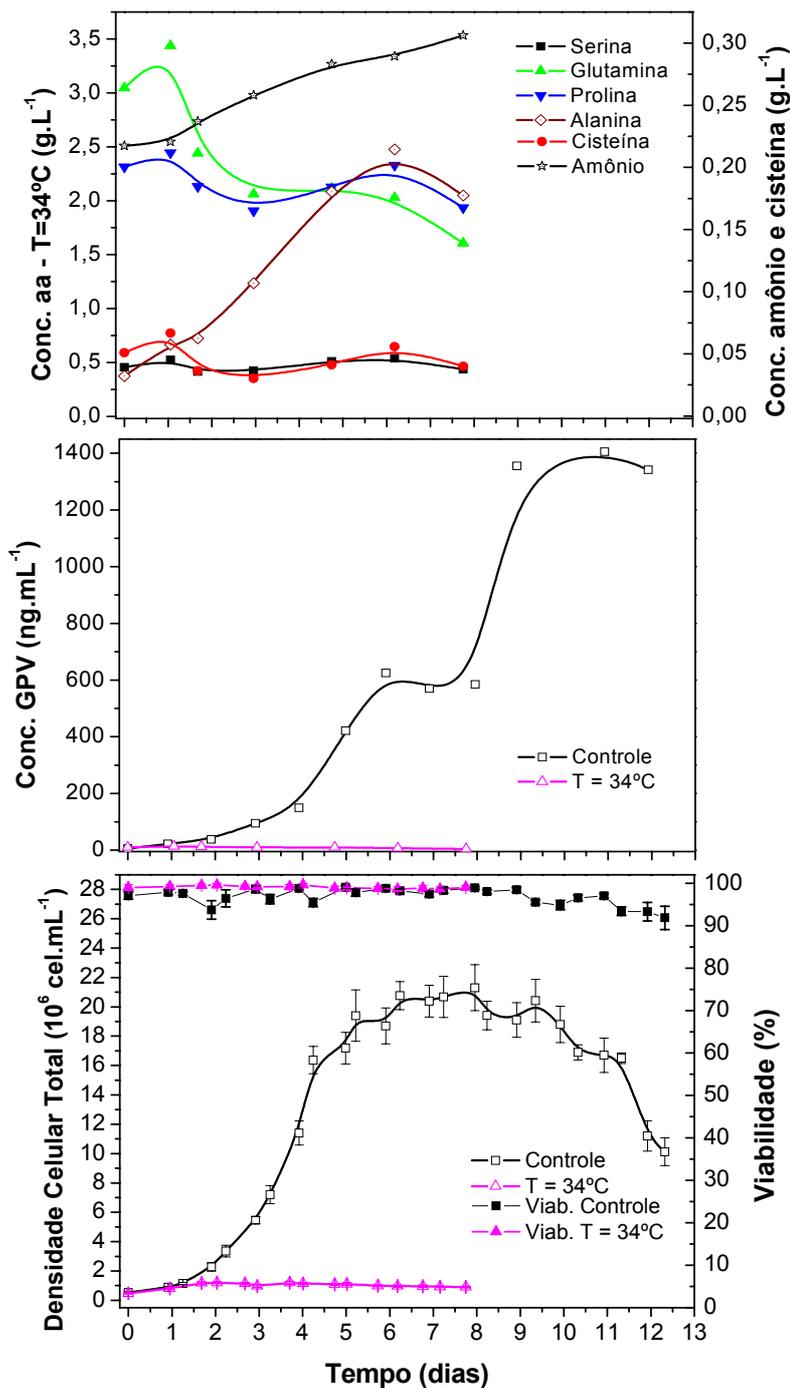


Figura 5.5. Comparação do crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C e 34°C em frasco Schott de 250mL, volume de trabalho de 30mL, pH 6,2 e 100 rpm.

Observou-se um consumo maior inicial de prolina e glutamina, mas suas concentrações estavam longe de zerar no final do cultivo, portanto o crescimento não foi

limitado por nenhum aminoácido. As quantidades dos metabólitos alanina e amônio foram muito pequenas quando comparados a experimentos anteriores.

Tabela 5.6. Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV das células S2AcGPV2K a 34°C e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,350 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina. Os experimentos foram realizados em frascos Schotts de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Experimento	Crescimento		Produção de GPV			
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	C_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{\text{GPV}/X}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle (T=28°C)	0,036 ± 0,001 (R ² =0,999)	21,30	1404,90	0,62*	14,04	5,36
T = 34°C	0,022 ± 0,001 (R ² =0,999)	1,20	13,76	0,23**	18,08	0,55

* valores válidos para 0<t<214 h; ** valores válidos para 0,67<t<27,77 h.

Esse experimento também apresentou uma baixa produção volumétrica e um baixo valor de produtividade máxima de GPV, reduzindo também a produção específica média em torno de 3 vezes, não mostrando ser uma boa estratégia para otimizar a produção de proteína recombinante. Contudo, devido ao não conhecimento da fisiologia da célula S2AcGPV2K em temperaturas supra-fisiológicas, e não constarem dados na literatura sobre esse assunto para células de inseto, torna-se difícil elaborar conclusões mais abrangentes sobre esse comportamento celular.

5.1.2.5 Comparação entre os experimentos realizados em frasco Schott em diferentes temperaturas de cultivo

As Figuras 5.6 e 5.7 e a Tabela 5.7 resumem os resultados obtidos nos experimentos realizados em frascos Schott em shaker com o objetivo de selecionar as temperaturas de cultivo que favoreçam a produção da glicoproteína rábica recombinante.

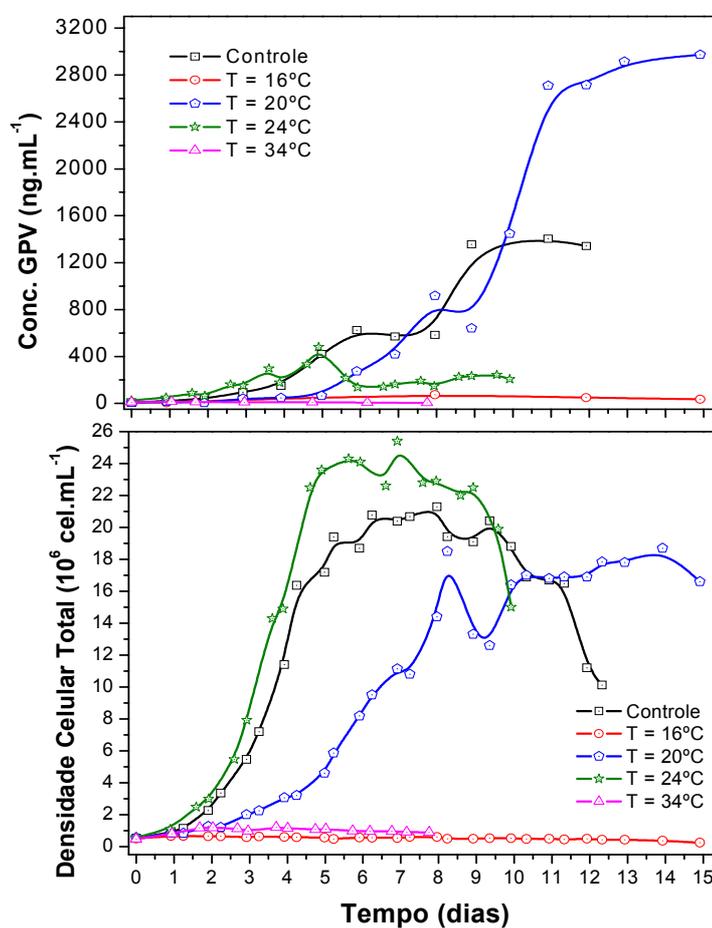


Figura 5.6. Comparação do crescimento e expressão de GPV em células S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em frasco Schott com meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina, a 100 rpm, utilizando diferentes temperaturas de cultivo como estratégia para aumentar a expressão de GPV.

Tabela 5.7. Comparação entre os parâmetros cinéticos determinados nos cultivos com células S2AcGPV2K em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,350 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina, em diferentes temperaturas de cultivo, em frascos Schott de 250 mL com volume de trabalho de 30 mL, pH 6,2 e agitação de 100 rpm para aumento da produção de GPV.

Experimento	Crescimento				Produção GPV			
	P_{max}^X (10 ⁶ cel. mL ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	X_{max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	t_{lag} (h)	C_{max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{GPV/X}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle	0,11	0,036	21,30	22,00	1404,90	0,62	14,04	5,36
16°C	0,02	0,009	0,67	*	75,15	0,70	116,59	0,40
20°C	0,10	0,020	18,70	53,52	2973,06	0,97	32,62	8,30
24°C	0,15	0,039	25,40	0	480,34	0,75	16,81	4,08
34°C	0,02	0,022	1,20	*	13,76	0,23	18,08	0,55

* não teve fase lag, a densidade celular se manteve inalterada.

A diminuição da temperatura de cultivo de 28°C para 24°C foi a estratégia de cultura que possibilitou o melhor crescimento celular, aumentando a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}) e a densidade máxima de células (X_{max}). A diminuição da temperatura de cultivo para 20°C, resultou em uma redução do crescimento e aumento significativo, da ordem de 7 vezes, da duração da fase lag. Em contrapartida ao baixo crescimento, a produção de GPV foi altamente favorecida a 20°C, aumentando significativamente os parâmetros cinéticos de produção. No entanto, os cultivos realizados a 16°C e a 34°C não apresentaram resultados satisfatórios nem para crescimento, nem para produção de GPV, não se mostrando boas estratégias para otimização da produção da glicoproteína rábica recombinante. Portanto, com o objetivo de aumentar a produção de proteína recombinante, a redução da temperatura de cultivo para 20°C foi a estratégia selecionada para ser testada em biorreator, ou seja, em um ambiente de cultura mais controlado.

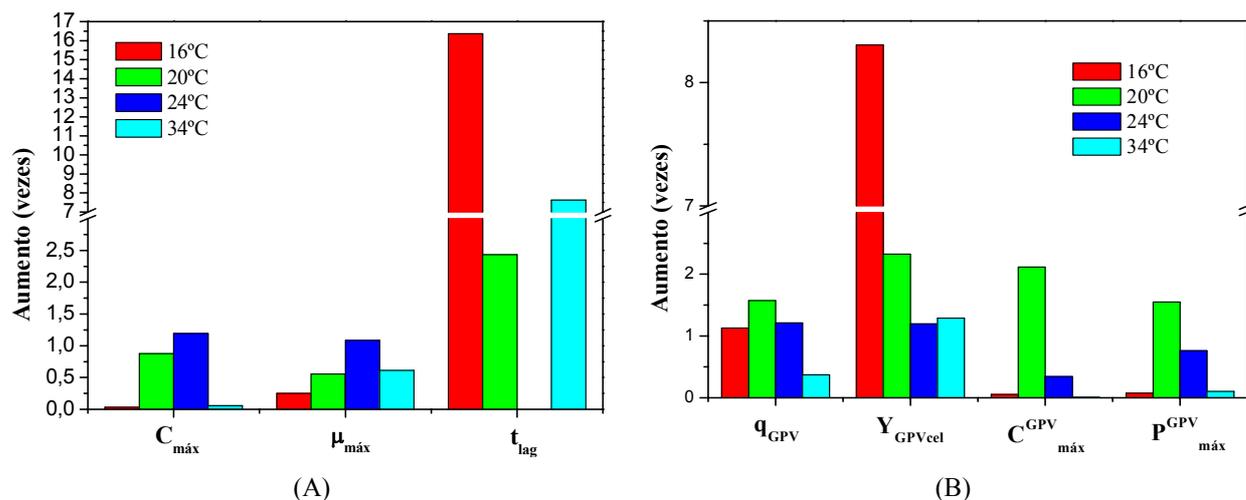


Figura 5.7. Efeito das diferentes temperaturas estudadas no crescimento (A) e na produção de GPV (B) das células S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em frascos Schott com meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina, a 100 rpm.

5.2 Experimentos em biorreator Bioflo 110

Uma vez determinadas as principais temperaturas de cultivo que proporcionaram uma melhor produção de GPV por células S2AcGPV2K em pequena escala, foram realizados cultivos em biorreator para verificar a reprodutibilidade dos dados obtidos, visando uma otimização da produção de proteína recombinante. No presente trabalho foram apresentados somente dados qualitativos de morte celular por LDH, não sendo possível a quantificação da mesma devido a discrepância dos dados, o que não seria uma análise confiável uma vez que o LDH pode estar sendo degradado por ação proteolítica.

5.2.1 Cultivo em temperatura de 28°C em biorreator

Esse primeiro experimento foi realizado para verificar a evolução do crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K quando cultivada em biorreator, em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672

g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina, a 28°C, OD=50%, pH 6,2 e agitação constante de 150 rpm. O objetivo foi utilizar o mesmo como experimento controle, assim como o seu semelhante realizado em Schott a 28°C, para comparação com os próximos realizados em biorreator em outras temperaturas de cultivo.

O crescimento das células S2AcGPV2K no biorreator Bioflo 110 apresentou uma fase lag semelhante à obtida no cultivo em frasco Schott a 28°C. A velocidade específica de crescimento obtida nesse cultivo, de 0,061 h⁻¹, foi aproximadamente duas vezes maior que a velocidade específica de crescimento dessa célula em Schott, sendo que a densidade celular máxima de 25,70.10⁶ cel.mL⁻¹ foi também superior quando comparada a 21,30.10⁶ cel.mL⁻¹ obtida no cultivo em escala menor. O término do crescimento exponencial da célula e o decaimento na produção de GPV nesse tempo de cultivo (aproximadamente 4 dias) está associado à exaustão de cisteína, como pode ser observado na Figura 5.8.

Além da glutamina, trabalhos apontam para a utilização essencial de cisteína por células Sf9. Radford, Reid e Greenfield (1997), realizaram cultivos de células Sf9 em meio Sf-900 II, em biorreator e obtiveram que o único aminoácido completamente consumido foi a cisteína, podendo-se atribuir a isto o fim do crescimento exponencial. Coincidente à sua exaustão foi observado o fim do consumo de outros aminoácidos, ou seja, tudo indica que a exaustão de cisteína compromete o metabolismo celular. Além disso, observou-se o comportamento deste aminoácido como limitante na produção de proteína recombinante uma vez que sua exaustão aconteceu 60 horas pós-infecção e foi relacionado à diminuição do rendimento de proteína recombinante.

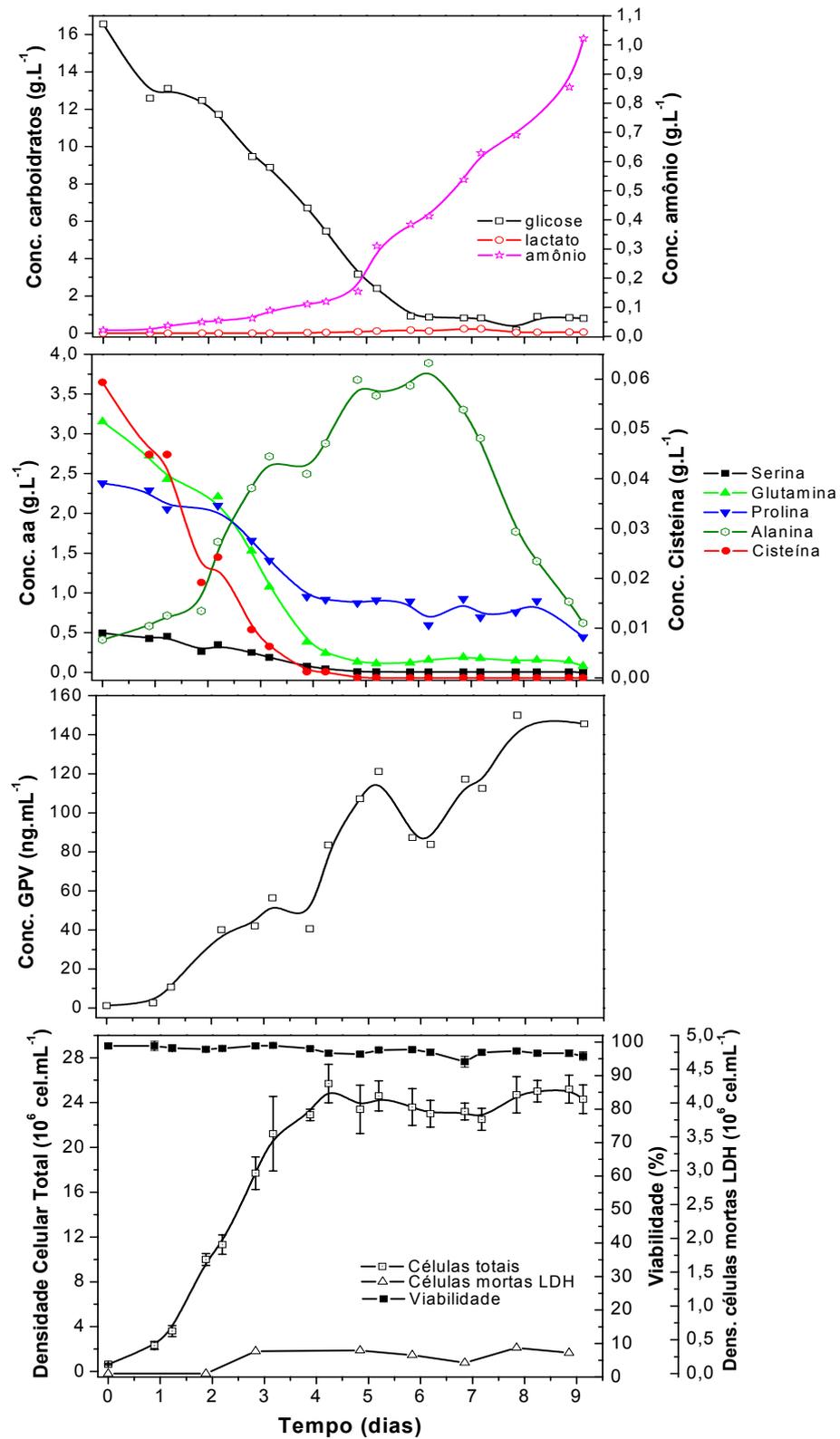


Figura 5.8. Crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K no experimento Bio-1 realizado em batelada em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 1,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,00672 g.L⁻¹ de cisteína e 0,066 g.L⁻¹ de serina a 28°C, OD=50%, agitação de 150 rpm, com controle de pH=6,2.

Devido à baixa concentração de glicose, glutamina e serina, a partir do 6º dia de cultivo a célula começa a consumir alanina. Além da alanina, a amônia, outro subproduto do metabolismo das células foi produzido em grande quantidade. Ikonomou et al. (2003) consideram que células de inseto não sofrem o efeito tóxico da amônia, como acontece com células de mamíferos. Benslimane et al. (2005) reportaram a alta produção de amônia por células de inseto Tn-5 em meio livre de soro, aproximadamente 400 mg.L^{-1} , quantidade semelhante a produzida pelas células S2AcGPV, enquanto que células Sf9 produziram amônia em quantidades desprezíveis. Öhman et al. (1995) concluíram que a formação de amônia em células Sf9 é induzida em condições limitantes de glicose, conseqüentemente, havendo a diminuição da formação de alanina.

No presente trabalho foi observado o consumo de alanina e uma intensificação na produção de amônio, após a concentração de glicose atingir uma concentração abaixo de 2 g.L^{-1} . Doverskog, Han e Häggström (1998) observaram que durante condições de cultivo normais quando glicose (e glutamina) está em excesso, nem lactato nem amônio são formados, mas alanina é o único metabolito formado em grandes quantidades. Porém, limitação de glicose causa uma troca no metabolismo, de alanina passa a formar amônio (ÖHMAN et al., 1995). Lactato normalmente não é formado através de células que crescem aeróbicamente (RHIEL e MURHAMMER, 1995).

Schneider, Marison e Von Stockar (1996) em uma revisão a respeito da importância da amônia em cultura de células animais afirmam que quando ocorre adição de sais de amônio na faixa de concentração de $17\text{-}85 \text{ mg.L}^{-1}$, há a diminuição da velocidade específica de crescimento celular. Nos experimentos realizados com a célula S2, não se observou possível efeito inibitório (desaceleração do crescimento exponencial) nessa faixa de concentração de amônio, uma vez que as concentrações de amônio atingidas no término da fase exponencial

foram de aproximadamente 150 mg.L^{-1} . Estes resultados novamente reforçam o conceito que células de inseto são menos sensíveis à presença de amônio que células de mamíferos.

5.2.2 Cultivo em temperatura de 20°C em biorreator

Devido ao fato da completa exaustão dos aminoácidos glutamina, serina, asparagina e cisteína observados no experimento a temperatura de 20°C em frasco Schott, esses aminoácidos foram adicionados em maior quantidade no biorreator, com o intuito desses aminoácidos não serem limitantes do crescimento e aumentarem a produção de proteína rábica recombinante. Sendo assim, o experimento foi realizado em meio Sf-900 II suplementado com $1,944 \text{ g.L}^{-1}$ de prolina, $2,35 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $0,0134 \text{ g.L}^{-1}$ de cisteína, $0,132 \text{ g.L}^{-1}$ de serina e $0,066 \text{ g.L}^{-1}$ de asparagina, a 20°C, OD=50%, pH 6,2 e agitação de 150 rpm. Overgaard et al. (2007) deixa claro que o perfil no metabolismo celular em células Sf9 responde vigorosamente a flutuações em diferentes temperaturas, e que algumas dessas trocas podem ser associadas com alteração no metabolismo e funções crioprotetoras das células.

A Figura 5.9 representa a comparação entre o crescimento, produção de GPV e metabolismo da célula S2AcGPV2K a uma temperatura de cultivo de 20°C. Nesse experimento podemos observar uma maior fase lag, quando comparado ao experimento realizado em biorreator a 28°C.

A redução da temperatura de cultivo de 28°C para 20°C diminuiu aproximadamente três vezes o valor de μ_{max} , passando de $0,061 \text{ h}^{-1}$ para $0,027 \text{ h}^{-1}$, contudo a densidade máxima de células aumentou de $25,70 \cdot 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ para $29,70 \cdot 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, como pode ser observado na Tabela 5.8, mantendo a viabilidade celular alta por todo o período de cultivo.

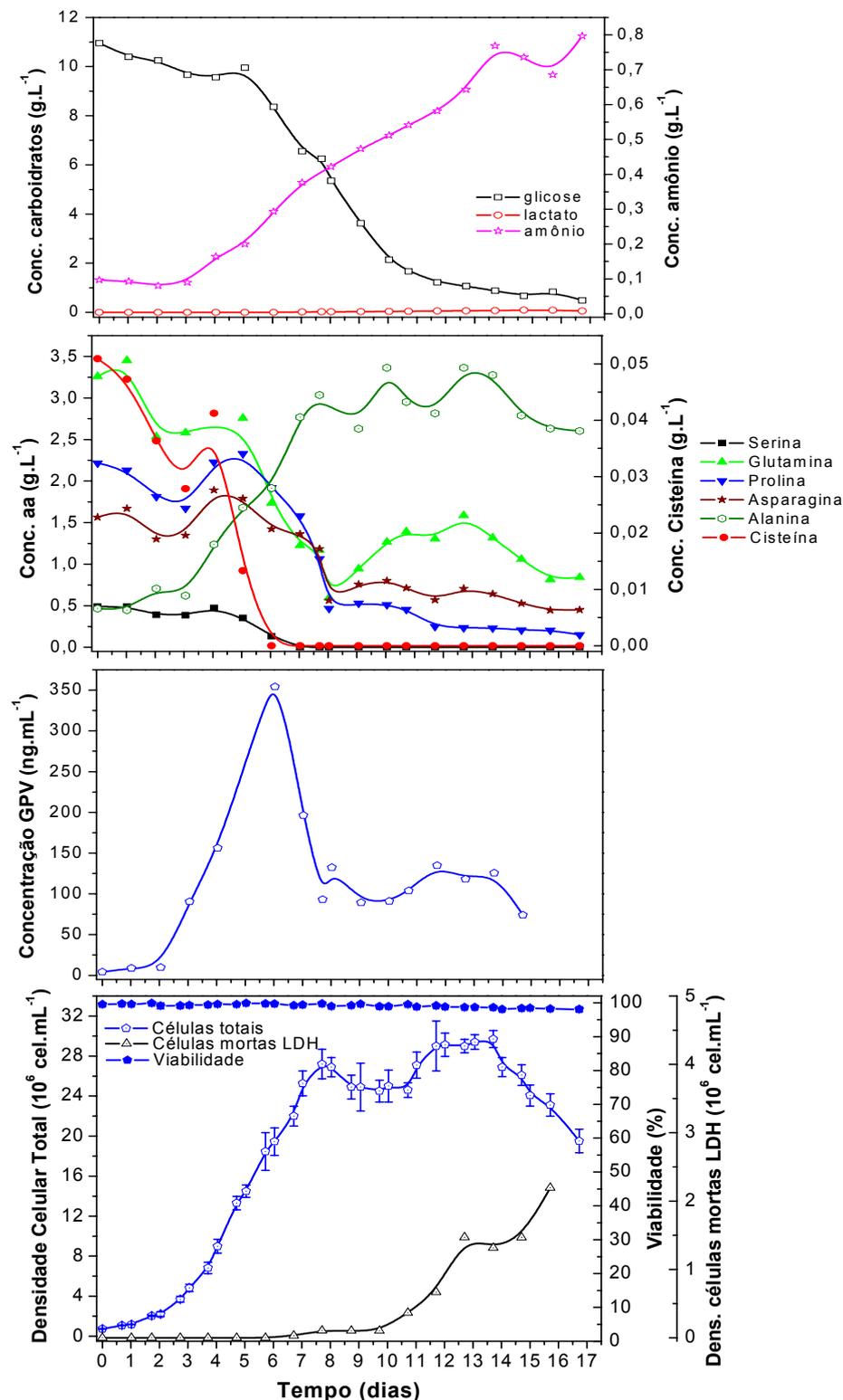


Figura 5.9. Crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K no experimento Bio-2 realizado em batelada em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina a 20°C, OD=50%, agitação de 150 rpm, com controle de pH=6,2.

A alta densidade de células mortas obtidas por LDH não confirma a viabilidade observada pelo método do corante de azul de tripan, isso se deve ao fato de que deve estar ocorrendo lise celular maior, já que o corante mede apenas as células mortas, enquanto que o método do LDH mede as células mortas e as lisadas.

Tabela 5.8. Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV das células S2AcGPV2K a 20°C (Bio 2) e 28°C (controle) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina. Os experimentos foram realizados em batelada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.

Experimento	Crescimento		Produção de GPV			
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	C_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{\text{GPV/X}}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle (T=28°C)	0,061 ± 0,001 (R ² =0,999)	25,70	149,98	0,16*	2,66	0,80
Bio 2 (T=20°C)	0,027 ± 0,001 (R ² =0,998)	29,70	354,14	0,43**	19,12	2,44

* valores válidos para 0<t<124,74 h; ** valores válidos para 0<t<145 h.

Houve uma diminuição no crescimento celular a 20°C aproximadamente no 7º dia de cultivo, voltando a crescer após o 11º dia de cultivo, e voltando a cair a partir 13º dia. Os substratos limitantes nessas condições foram cisteína e serina, que se esgotaram no 6º e 7º dia de cultivo, respectivamente, não havendo esgotamento de glicose ou de outros aminoácidos no final do cultivo. Os metabólitos alanina e amônio foram produzidos em grandes quantidades podendo ter contribuído, também, para a inibição do crescimento celular.

Não houve escassez de glutamina, contudo a mesma passa a ser produzida por um período curto de tempo durante o cultivo, como acontece nos outros experimentos realizados com suplementação de aminoácidos no meio de cultura. A glutamina é um nutriente que sofre

intenso metabolismo, podendo ser convertida em glutamato, alanina ou amônio. Entretanto, em alguns casos, segundo Öhman et al. (1996), a glutamina pode ser sintetizada pelas próprias células em quantidades capazes de suprir o crescimento celular.

Em contrapartida ao baixo crescimento, a produção de proteína recombinante teve todos os seus parâmetros cinéticos elevados. A produção volumétrica de GPV foi aproximadamente 2,4 vezes maior no experimento realizado a 20°C quando comparada ao experimento controle a 28°C, a produção específica média teve um aumento de 2,7 vezes, o rendimento de GPV em relação ao número de células aumentou aproximadamente 7 vezes e a produtividade máxima de GPV teve um acréscimo de 3 vezes, como pode ser observado na Tabela 5.8. Porém, não se observou a reprodutibilidade dos dados obtidos em Schott, onde a produção volumétrica de GPV foi cerca de nove vezes maior que no biorreator. Uma explicação plausível para este comportamento é a diferença existente do perfil de oxigenação em frasco Schott e no biorreator. No frasco Schott há uma queda monotônica de concentração de oxigênio dissolvido, atingindo valor perto de zero no final desse período. Como no biorreator a concentração de oxigênio dissolvido é controlada ao redor de 50 % da saturação com ar, o valor de μ_{\max} é mais favorecido neste equipamento do que no frasco Schott, restando menos energia metabólica da degradação de carboidratos e aminoácidos para a síntese da glicoproteína recombinante. Assim, aminoácidos limitantes na síntese desse produto, tais como serina e cisteína, se esgotam mais cedo no cultivo em biorreator.

Esse raciocínio também justifica a degradação da proteína, já que o esgotamento prematuro de cisteína e serina durante o cultivo aconteceu no biorreator no 6º dia e serina no 7º dia de cultivo e no frasco Schott a cisteína se esgotou no 12º e a serina no 13º dia. Estes são dois aminoácidos que apresentam um papel muito importante no dobramento e estabilização da proteína. A serina participa intensivamente no processamento da proteína através da glicosilação das cadeias laterais, tendo como função auxiliar o bom dobramento e proteger a

molécula de degradação por proteases (JENTOFT, 1990). Por outro lado, a cisteína é bem conhecida pelo seu papel na formação de pontes de enxofre covalentes representando um papel crucial na estabilização de proteínas (FREEDMAN, 1984). Com os resultados obtidos, fica evidente que o meio Sf-900 II tem que ser suplementado com serina e cisteína para realizar uma ótima produtividade e uma proteína recombinante estável.

5.2.3 Cultivo em três diferentes temperaturas, 20°C, 18°C e 16°C em biorreator

Uma vez que se observou que a redução do crescimento celular poderia ser responsável pelo aumento da produção da proteína, um experimento em biorreator em etapas com temperatura decrescente foi realizado com o intuito de verificar a eficácia de temperatura mais baixas na otimização da produção de GPV.

Analisando os resultados obtidos em shaker, observou-se que a diminuição da temperatura de crescimento de 28°C para 20°C foi a estratégia que originou resultado mais satisfatório no aumento da produção de GPV. No entanto, a 16°C a célula não mostrou um bom crescimento e conseqüentemente não produziu grandes quantidades de proteína, porém obteve-se um bom rendimento de GPV em relação ao número de células. Contudo, tendo em mente uma estratégia para aumentar a produção baseada na redução do crescimento, optou-se por realizar um experimento que se iniciou na temperatura ótima para produção de GPV (20°C), obtida com base nos experimentos realizados anteriormente em frasco Schott, e no momento em que a célula iniciou a fase de crescimento exponencial, atingindo um número razoável de células, essa temperatura foi reduzida para 18°C com o intuito de diminuir o crescimento, onde observou-se uma nova fase de adaptação da célula nessa temperatura. Essa temperatura foi mantida até que a célula iniciasse novamente a fase exponencial, e então foi reduzida para 16°C, mantendo-se este valor até o final do experimento.

A Figura 5.10 representa os resultados obtidos para crescimento celular, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K nas três diferentes temperaturas de cultivo, 20°C, 18°C e 16°C.

Esse foi o experimento em que se obteve a maior densidade máxima celular, chegando a 31.10^6 cel.mL⁻¹, valor até então não encontrado na literatura para cultivo de células S2.

O elevado crescimento apresentado pela célula S2 nos experimentos realizados, embora esse tenha sido observado um tempo maior de duplicação celular, quando comparado às demais células de inseto e células de mamíferos, pode estar associado ao menor tamanho da célula S2 e também à pequena duração do ciclo celular determinado em embriões de *Drosophila*, de aproximadamente 16 minutos (DOUGLAS et al., 2005), o que determina a duplicação de uma célula, ou seja, seu crescimento em cultura é a evolução do ciclo celular,. Se esta evolução ocorre de maneira rápida, é razoável esperar que a duplicação ocorra com uma velocidade maior. Este maior crescimento da célula de *Drosophila* é um fator importante a ser considerado na sua escolha como uma célula para a produção de proteínas recombinantes em escala industrial.

A comparação entre os parâmetros cinéticos de crescimento e produção de GPV obtidos no experimento realizado em degraus de temperatura e no experimento controle (28°C) estão representados na Tabela 5.9.

A velocidade específica de crescimento a 20°C foi aproximadamente três vezes menor quando comparada ao controle (28°C). Em seguida a célula teve um rápido crescimento a 18°C, o que não seria esperado nesse experimento devido a dados obtidos anteriormente em experimentos em Schott com diminuição da temperatura de cultivo, e a 16°C houve uma diminuição cerca de duas vezes no valor de μ_{\max} quando comparado ao crescimento a 20°C, observado no início do experimento, como pode ser visto na Tabela 5.9.

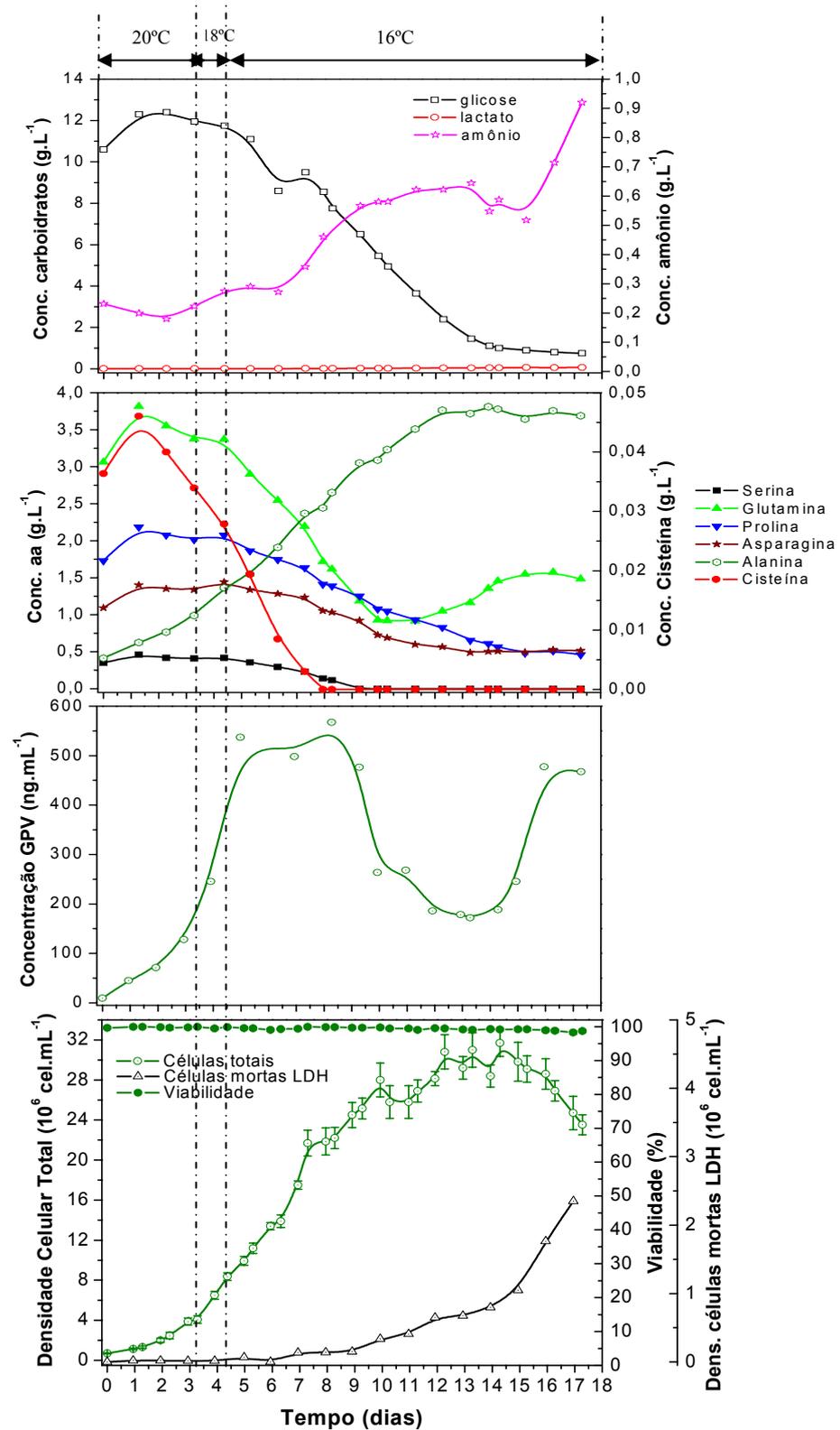


Figura 5.10. Crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K no experimento Bio-3 realizado em batelada em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina, OD=50%, agitação de 150 rpm, com controle de pH=6,2 e temperatura em degraus, 20°C, 18°C e 16°C.

Tabela 5.9. Parâmetros cinéticos de crescimento e produção de GPV das células S2AcGPV2K a 20°C, 18°C e 16°C (Bio 3) comparados com o cultivo controle (28°C) em meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina. O experimento foi realizado em batelada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.

Experimento	Crescimento		Produção de GPV			
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	C_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{\text{GPV/X}}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle (T=28°C)	0,061 ± 0,001 (R ² =0,999)	25,70	149,98	0,16*	2,66	0,80
Bio 3 (T=20°C→18°C →16°C)	0,024 ± 0,001 (20°C, R ² =0,997) 0,027 ± 0,002 (18°C, R ² =0,997) 0,012 ± 0,001 (16°C, R ² =0,989)	31,00	567,38	0,98**	21,85	2,86

* valores válidos para 0<t<124,74 h; ** valores válidos para 0<t<119,5 h.

As altas densidades de células mortas por LDH observadas nesse experimento em comparação ao experimento controle (Bio 1) se deve ao fato de ter ocorrido uma lise celular maior.

A estratégia de reduzir o crescimento celular mais uma vez favoreceu a produção de proteína recombinante, tendo um aumento significativo em todos os parâmetros cinéticos de produção de GPV, aumentando em torno de quatro vezes a produção volumétrica e oito vezes o rendimento de GPV por 10⁶ células. Contudo, mais uma vez se observou o esgotamento dos aminoácidos serina e cisteína (em torno do 9º e 8º dia de cultivo, respectivamente), onde se observa o decaimento da produção da proteína, o que novamente reforça a importância desses aminoácidos na produção e estabilidade da GPV. Os demais aminoácidos foram consumidos, porém nenhum chegou à completa exaustão.

Chama a atenção o fato de a produção de glicoproteína ter sido retomada numa fase em que a célula estava em declínio bem acentuado. Aparentemente, nas condições de crescimento celular nulo que se observam nessa fase do cultivo, as fontes de energia glicose e prolina, que neste experimento em particular ainda se faziam presentes em quantidades significativas, estavam sendo consumidas apenas para manutenção celular, assim como para síntese da GPV e seu transporte para a membrana, como foi observado também em estudos realizados por Doverskong, Han e Häggström (1998) com células Sf9.

A concentração de glicose tornou-se baixa no final do cultivo, onde houve uma alta concentração de alanina e amônio, contudo acredita-se que os valores alcançados não tiveram efeito inibitório no crescimento celular. Podemos observar também que houve um aumento na concentração de glicose no início do cultivo, isso se deve ao fato da mudança no metabolismo da célula quando submetida a baixas temperatura. Overgaard et al. (2007) observaram que, em um experimento realizado com *Drosophila melanogaster*, houve um aumento na concentração de glicose e alanina imediatamente após as moscas serem submetidas a um choque frio em baixas temperaturas ou a um tratamento de rápida adaptação a frio, onde notaram um aumento no nível de açúcar, particularmente de glicose e trealose.

5.2.4 Cultivo a temperatura de 20°C em biorreator em batelada-alimentada

Com o objetivo de aumentar a produção de proteína recombinante, de modo que ela fosse produzida em grandes quantidades e de forma estável, optou-se por realizar um experimento em batelada-alimentada com alimentação de uma maior quantidade de serina e cisteína no meio de cultivo até então utilizado, já que se tem observado o papel fundamental desses dois aminoácidos no meio, uma vez que basendo-se em experimentos anteriores

observou-se a degradação de GPV em condições de baixa concentração ou exaustão dos mesmos.

O experimento em batelada alimentada foi realizado nas seguintes condições: temperatura de 20°C, 150 rpm, pH 6,2, OD de 50%, volume inicial no biorreator de 850 mL, meio Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina, em batelada-alimentada com vazão de alimentação de 3 mL.h⁻¹ com meio Sf-900 II suplementado com 0,86g.L⁻¹ de cisteína e 7,4 g.L⁻¹ de serina.

A Figura 5.11 representa os dados de crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K a uma temperatura de cultivo de 20°C em biorreator em batelada-alimentada.

A Tabela 5.10 apresenta a comparação entre os parâmetros cinéticos de crescimento e produção de GPV obtidos no experimento realizado a 20°C em batelada-alimentada e no experimento controle (28°C) realizado em batelada.

Quanto ao metabolismo da célula, podemos observar que o objetivo de manter a concentração de cisteína praticamente constante no meio foi alcançado até o momento no qual se coletou dados do experimento, porém pode-se observar um aumento na concentração de serina, o que poderia ser considerado em um próximo experimento, para uma possível diminuição da concentração de alimentação desse aminoácido, uma vez que a célula estava crescendo bem e não estava tendo degradação da glicoproteína.

Mesmo incompleto, esse experimento apresentou bons resultados de produção de proteína rábica recombinante, pois obteve a maior concentração volumétrica e o maior rendimento de GPV por células de todos os experimentos realizados em biorreator, valores os quais poderiam ser maiores até o final do experimento.

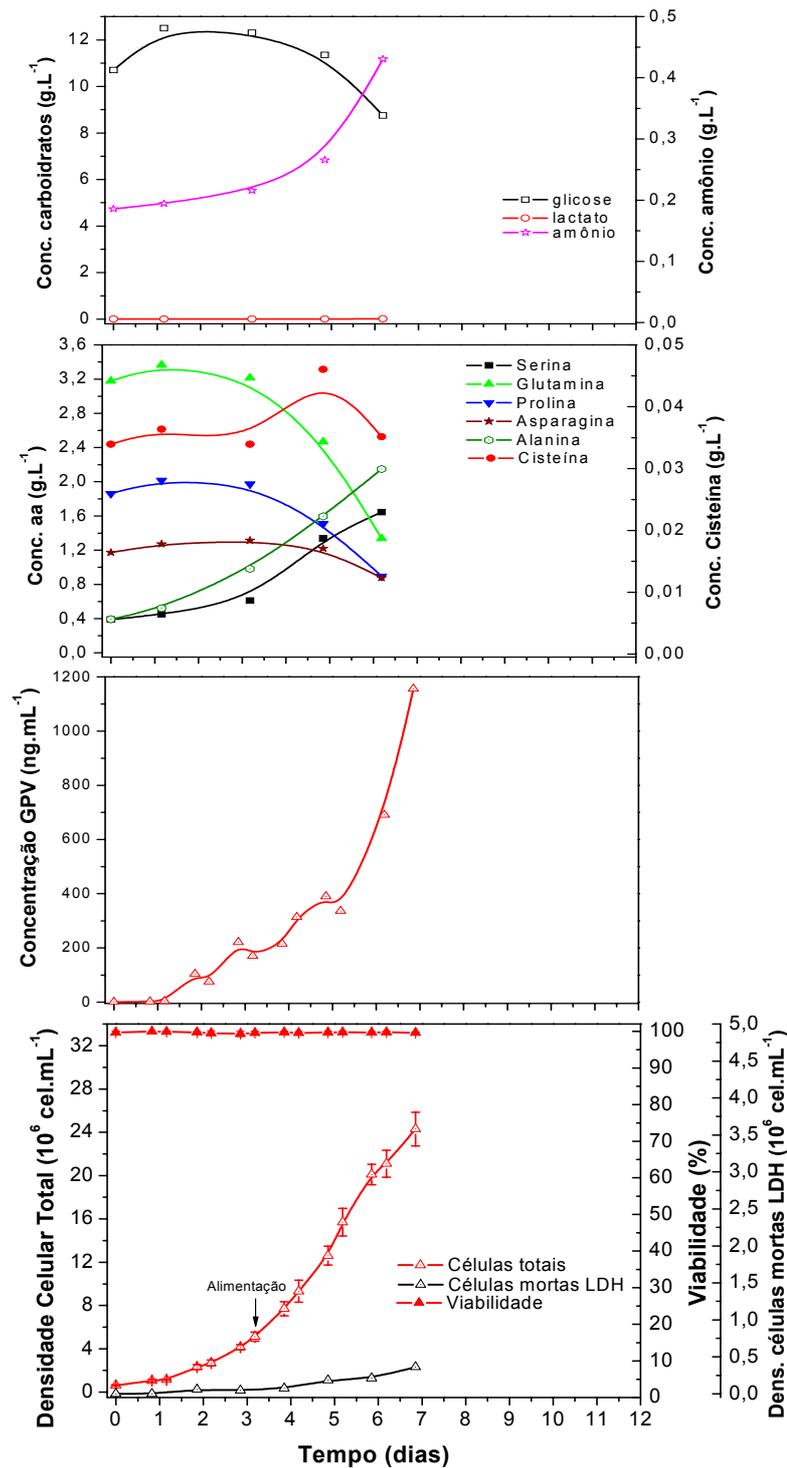


Figura 5.11. Crescimento, produção de GPV e metabolismo das células S2AcGPV2K no experimento Bio-4 realizado em batelada-alimentada com meio Sf-900 II suplementado com serina e cisteína na vazão de $F=3\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$, volume inicial do biorreator de 850 mL. Meio inicial: Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina a 20°C, OD=50%, agitação de 150 rpm, com controle de pH=6,2.

Tabela 5.10. Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento e produção de GPV das células S2AcGPV2K a 20°C (Bio 4) em batelada-alimentada e 28°C (controle) em batelada, em meio de cultura Sf-900 II suplementado com 1,944 g.L⁻¹ de prolina, 2,35 g.L⁻¹ de glutamina, 0,0134 g.L⁻¹ de cisteína, 0,132 g.L⁻¹ de serina e 0,066 g.L⁻¹ de asparagina. Os experimentos foram realizados em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.

Experimento	Crescimento		Produção de GPV			
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	C_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹)	\bar{q}_{GPV} (ng.10 ⁻⁶ cel.h ⁻¹)	$Y_{\text{GPV}/X}$ (ng.10 ⁻⁶ cel)	P_{\max}^{GPV} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle (T=28°C)	0,061 ± 0,001 (R ² =0,999)	25,70	149,98	0,16*	2,66	0,80
Bio 4 (T=20°C)	^a 0,031 ± 0,001 (R ² =0,994) ^d 0,024 ± 0,001 (R ² =0,997)	24,3	1155,94	0,82**	32,5	7,03

^a – antes da alimentação; ^d – depois da alimentação

* valores válidos para 0<t<24,74 h; ** valores válidos para 0<t<164,42 h.

Vale ressaltar que esses resultados são preliminares ou incompletos, uma vez que o experimento não foi concluído. Apesar de ter apresentado bons resultados, a continuidade do experimento não foi possível devido a contaminação microbiana detectada no 7º dia, o que fez com que o experimento fosse encerrado antes do previsto. Dado o fato desse experimento ter apresentado bons resultados mesmo estando incompleto, o ideal seria repeti-lo para se ter certeza da hipótese de que se manter as concentrações de serina e cisteína suficientes no meio para suprir as necessidades da célula se obterá altas quantidades de proteína e de forma estável para poder se utilizar em bioprocessos em larga escala.

5.2.5 Comparação entre os experimentos realizados em biorreator em diferentes temperaturas de cultivo

A comparação dos resultados obtidos nos experimentos em biorreator com o objetivo de aumentar a produção da GPV encontram-se apresentados na Tabela 5.11 e Figuras 5.12 e 5.13.

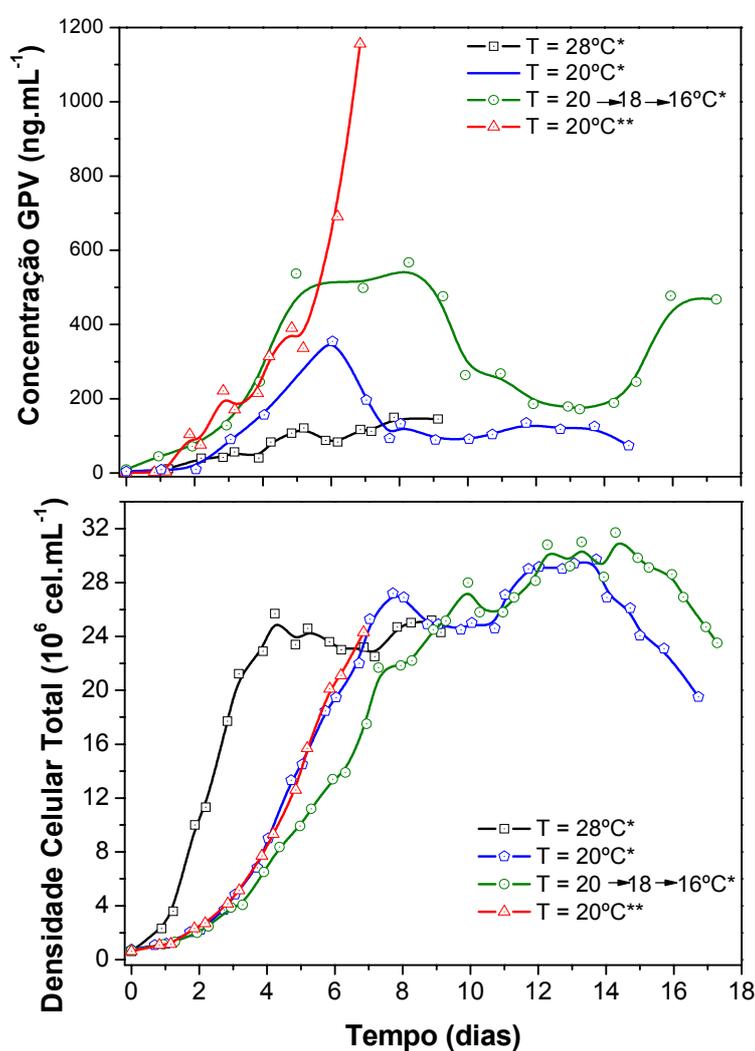


Figura 5.12. Comparação do crescimento e expressão de GPV em células S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em biorreator com meio Sf-900 II suplementado com aminoácidos a 150 rpm, utilizando diferentes temperaturas de cultivo como estratégia para aumentar a expressão de GPV. * batelada; ** batelada-alimentada.

O experimento realizado em três diferentes temperaturas (Bio 3) foi a estratégia de cultura que apresentou os menores valores de velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), contudo apresentou a maior densidade máxima de células (X_{\max}). A diminuição da temperatura de cultivo para 20°C (Bio 2), resultou em uma redução do crescimento e da produtividade máxima celular e aumento da fase lag, quando comparado ao experimento controle (Bio 1), onde se observou uma pequena fase lag. Dentre os experimentos analisados, o Bio 4, apesar de estar incompleto, foi o que apresentou uma melhor produção de GPV, apresentando produção volumétrica, produtividade máxima e rendimento de GPV por 10^6 células de aproximadamente sete, oito e doze vezes, respectivamente, maior que a do experimento Bio 1.

Tabela 5.11. Comparação entre os parâmetros cinéticos determinados nos cultivos com células S2AcGPV2K em diferentes temperaturas de cultivo, em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50%, agitação de 150 rpm e meio Sf-900 II suplementado com aminoácidos para aumento da produção de GPV.

Experimento	Crescimento				Produção GPV			
	P_{\max}^X (10^6 cel. $\text{mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	μ_{\max} (h^{-1})	X_{\max} (10^6 cel. mL^{-1})	t_{lag} (h)	C_{\max}^{GPV} ($\text{ng}.\text{mL}^{-1}$)	\bar{q}_{GPV} ($\text{ng}.\text{10}^{-6}$ cel. h^{-1})	$Y_{\text{GPV}/X}$ ($\text{ng}.\text{10}^{-6}$ cel)	P_{\max}^{GPV} ($\text{ng}.\text{mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Bio 1 (T=28°C)	0,25	0,061	25,70	21,12	149,98	0,16	2,66	0,80
Bio 2* (T=20°C)	0,15	0,027	29,70	49,00	354,14	0,43	19,12	2,44
Bio 3 (T=20→18 → 16°C)	0,12	0,024 (20°C) 0,027 (18°C) 0,012 (16°C)	31,00	70,50	567,38	0,98	21,85	2,86
Bio 4** (T=20°C)	0,15	^a 0,031 ^d 0,024	24,30	52,25	1155,94	0,82	32,50	7,03

* batelada; ** batelada-alimentada; ^a – antes da alimentação; ^d – depois da alimentação

Dentre os experimentos analisados, o que se mostrou mais eficiente para a otimização da produção de GPV em biorreator foi o experimento realizado a 20°C em batelada-alimentada (Bio 4), que apesar de não ter sido concluído, foi o que demonstrou melhores resultados.

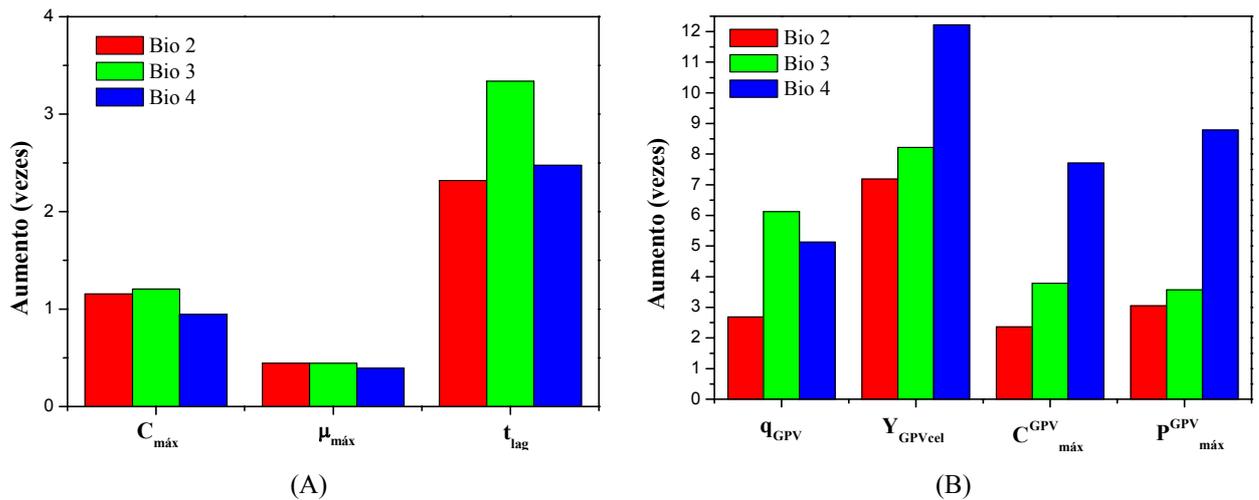


Figura 5.13. Efeito das diferentes temperaturas estudadas no crescimento (A) e na produção de GPV (B) das células S2AcGPV2K no conjunto de experimentos realizados em Biorreator com meio Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Para o cálculo do efeito de μ_{\max} foi utilizado no experimento Bio 3 o valor de μ_{\max} correspondente a temperatura de 18°C e para o Bio 4 foi utilizado μ_{\max} depois da alimentação.

6 CONCLUSÕES

As conclusões obtidas sobre o trabalho de pesquisa realizado são as seguintes:

1. A adição de $1,944 \text{ g.L}^{-1}$ de prolina, $1,350 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $0,00672 \text{ g.L}^{-1}$ de cisteína e $0,066 \text{ g.L}^{-1}$ de serina no meio de cultura Sf-900 II praticamente não alterou a velocidade específica de crescimento máxima, contudo aumentou a densidade máxima de células, indicando que o meio Sf-900 II ainda não está otimizado para as necessidades nutricionais da célula S2, uma vez que foi originalmente desenvolvido para a linhagem celular Sf9.
2. Os substratos identificados como limitantes no cultivo da célula S2AcGPV2K em meio de cultura livre de soro Sf-900 II suplementado com $1,944 \text{ g.L}^{-1}$ de prolina, $1,350 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $0,00672 \text{ g.L}^{-1}$ de cisteína e $0,066 \text{ g.L}^{-1}$ de serina foram glutamina, serina, cisteína e prolina, embora não possa ser descartada a possibilidade desta limitação estar ocorrendo em função da alta formação de amônia. As células S2AcGPV2K apresentaram uma extrema versatilidade metabólica em função das diferentes disponibilidades de nutrientes no meio de cultivo. O metabolismo desta célula no meio de cultura utilizado foi diferenciado, se comparado com as demais células de inseto. A glicose não é a principal fonte de energia para o crescimento da célula, mas parece desempenhar um papel importante na manutenção da célula na fase estacionária de crescimento. Os subprodutos amônia e alanina foram produzidos em altas quantidades (concentrações de $2,31$ e $9,20 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente para amônio e alanina), porém não se observou morte celular significativa, podendo-se considerar que as células empregadas apresentam uma resistência singular à presença desses subprodutos.
3. Dentre os experimentos realizados em frasco Schott, a redução da temperatura de cultivo para 24°C foi a estratégia de cultura que possibilitou o melhor crescimento da célula. A diminuição da temperatura de cultivo para 20°C resultou em uma redução do crescimento e

aumento significativo, da ordem de 7 vezes, da duração da fase lag. Em contrapartida ao baixo crescimento, a produção de GPV foi altamente favorecida a 20°C. No entanto, os cultivos realizados a 16°C e a 34°C não apresentaram resultados satisfatórios nem para crescimento, nem para produção de GPV, não mostrando serem boas estratégias para otimização da produção dessa glicoproteína.

4. A estratégia de controlar o crescimento celular para se obter uma maior produção de proteína, demonstrou ser eficiente, pois no experimento realizado em frasco Schott em temperatura reduzida a 20°C atingiu-se níveis de expressão cerca de 2 vezes superiores ao obtido no cultivo controle a 28°C e sem queda de concentração de GPV. Os níveis de produção atingidos neste experimento (2973,066 ng.mL⁻¹) foram os maiores obtidos neste trabalho.

5. O redução de temperatura em três etapas, foi a estratégia de cultura, realizada em biorreator (Bio 3), que apresentou a menor velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e a maior densidade máxima de células (X_{\max}). Dentre os experimentos realizados em biorreator, o Bio 4 (20°C – batelada-alimentada) foi o que apresentou uma melhor produção de GPV, possuindo um aumento em todos os parâmetros cinéticos de produção quando comparados ao experimento controle Bio 1 (28°C).

6. Dentre os experimentos analisados em biorreator o que se mostrou mais eficiente para a otimização da produção de GPV foi o experimento realizado a 20°C em batelada alimentada, porém como o experimento não foi concluído, não se sabe como as células se comportariam até o final do experimento. Contudo pôde-se notar que quando não há escassez de serina e cisteína, principalmente cisteína, no meio de cultura, não se observa degradação da proteína, comportamento que coloca em evidência a importância desses aminoácidos na produção e estabilização da GPV.

7. Os resultados obtidos nos experimentos mostraram uma maior expressão da proteína recombinante nas temperaturas mais baixas, especialmente quando μ_{\max} é baixo.
8. Entre os experimentos concluídos em biorreator, o realizado a 20°C em batelada foi o que proporcionou melhores resultados, apesar de possuir uma produção menor do que o experimento realizado em frasco Schott nas mesmas condições. No entanto, como ainda é insuficiente o conhecimento relacionado à produção da glicoproteína recombinante pelas células S2AcGPV2K em cultura, não se pode afirmar que a expressão de GPV em células de *Drosophila* em biorreator não seja eficiente. De acordo com a literatura, a diminuição da concentração de GPV observada em determinados experimentos, como no Bio-2 por exemplo, pode ser atribuída à degradação e/ou agregação da proteína. Sabe-se também que a expressão desta glicoproteína apresenta ainda uma série de dificuldades que vão desde baixos níveis até sua expressão com alterações conformacionais.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os próximos trabalhos que venham a ser desenvolvidos com as células de inseto S2AcGPV2K2, sugere-se:

1 – Um estudo mais detalhado da metodologia para quantificação de morte celular através da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH), uma vez que neste trabalho verificou-se inconsistência com dados obtidos de lise celular obtidos através de contagem em hemacitômetro.

2 – Estudos em biorreator operado em batelada-alimentada para otimizar a produção de GPV, já que foi mostrado no presente trabalho que experimentos com suplementação de aminoácidos no meio de cultura são suficientes para se chegar a resultados com alta produtividade de GPV.

3 – Realização de ensaios de eletroforese ou utilização de outras metodologias para avaliar a agregação ou degradação da proteína nas condições dos experimentos realizados.

4 – Estudar a influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção da glicoproteína rábica nas temperaturas de cultivo estudadas nesse trabalho, uma vez que se observou uma maior produção de proteína nos experimentos realizados em frasco Schott, os quais apresentam uma diminuição na concentração de oxigênio dissolvido no meio no decorrer do cultivo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATHOS, S. N. Insect cell cultivation in bioreactors, **Proceeding of the engineering foundation conference on cell culture engineering**, Florida: Palm Coast, 1988. p. 10.

AGATHOS, S. N. Production scale insect cell culture. **Biotechnology Advances**, v.9, p.51-68, 1991.

AGATHOS, S. N. Insect cell bioreactors. **Cytotechnology**, v. 20, p.173-189, 1996.

ALDECOA, A. et al. Mammalian calcitonin receptor-like receptor/receptor activity modifying protein complexes define calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors in *Drosophila* Schneider 2 cells. **FEBS Letters**, v.471, p.156-160, 2000.

AL-FAGEEH, M.B. et al. The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.93, n.5, p.829-835, 2006.

ASHRAF, S. et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 1-14, 2005.

ASTRAY, R.M. et al. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. **Biotechnology Journal**, v.3, p.98–103, 2008.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: Mc-Graw-Hill International Editions, 1986.

BATISTA, F.R.X. **Desenvolvimento de meio de cultura para células de inseto e avaliação do potencial de replicação de baculovírus**. 2003. 278 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BÉDARD, C.; TOM, R.; KAMEN, A.A. Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. **Biotechnology Progress**, v. 9, p.615-624, 1993.

BÉDARD, C. et al. Maximization of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high-density batch cultures. **Cytotechnology**, v. 15, p.129–138, 1994.

BÉDARD, C.; PERRET, S.; KAMEN, A.A. Fed-batch culture of Sf-9 cells supports 3×10^7 cells per ml and improves baculovirus expressed recombinant protein yields. **Biotechnololy Letters**, v.19, p.629– 632, 1997.

BELLO, R.A. **A characterization study of airlift contactors for applications to fermentations**. Ph. D. Thesis, University of Waterloo, Canadá, 1981.

BELLOSTA, P. et al. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, p. 614 - 625, 1995.

BENSLIMANE, C. et al. Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radiolabeling studies. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 78-86, 2005.

BHATIA, R. et al. Insect cell physiology. **Cytotechnology**, v.24, p.1-9, 1997.

BIRCH, J.R. et al. Antibody production with airlift fermentors. In: Lydersen, B.K. **Large Scale Cell Culture Technology**. New York: Hanser, 1987. p. 1-20.

BLENKE, H. Loops reactors. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 13, p. 121, 1979.

BRIGHTY, D. W.; ROSENBERG, M. A Cis-acting repressive sequence that overlaps the 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. et al. 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.

BUMELIS, V.A. et al. Investigation of thermal stability of recombinant human interferon-gamma. **Biologija**. v.2, p. 37-41, 2002.

CARON, A. W. et al. baculovirus expression system scale up by perfusion of high-density Sf-9 cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 881 - 891, 1994.

CARTWRIGHT, T. **Animal cells as bioreactors**. Cambridge University Press, p.184, 1994.

CHA, H.J. et al. 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.; GREENFIEL, P.F.; REID, S. Optimising fed-batch production of recombinant proteins using the baculovirus expression vector system. **Biotechnology Bioengineering**, v.59, p.178–188, 1998.

CHICO, E.; JÄGER, V. Perfusion culture of baculovirus-infected BTI-Tn-5B1-4 insect cells: a method to restore cell-specific β -trace glycoprotein productivity at high cell density. **Biotechnology Bioengineering**, v.70, p.574–586, 2000.

CHIOU, T.W.; HSIEH, Y.C.; HO, C.S. High density culture of insect cells using rational medium design and feeding strategy. **Bioprocess Engineering**, v.22, p.483–491, 2000.

CHISTI, M.Y.; MOO-YOONG. Airlift reactors: characteristics, applications and design considerations. **Chemical Engineering Community**, v. 60, p. 195, 1987.

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

CLARK, K.J.R.; CHAPLIN, F.W.R.; HARCUM, S.W. Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1888-1892, 2004.

COELHO, S. Método permite encontrar seqüências ocultas do genoma. **Ciência Hoje**. São Paulo: 19.02.2002.

COHEN, S.A.; MEYS, M.; TARVIN, T.L. **Pico-Tag advanced methods manual**. Bedford: Millipore, 1989.

COSTA, W. A. et al. **Manual técnico do Instituto Pasteur: profilaxia da raiva humana**. 2. 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.; BIVINS, J.E. Influence of simulated microgravity on the longevity of insect-cell culture. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 326-332, 1997.

COX, M.M.J. Commercial production in insect cells: one company's perspective. **Bioprocess International**, p.2-5, 2004.

CULP, J. S. et al. Regulated expression allows high level production and secretion of HIV-1 gp120 envelope glycoprotein in *Drosophila* Schneider cells. **Bio/Technology**, v.9, p.173-177, 1991.

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.

DEUTSCHMANN, S.M.; JÄGER, V. Optimization of the growth conditions of Sf21 insect cells for high-density perfusion culture in stirred-tank bioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.6, p.506-512, 1994.

DOUGLAS, R.M. et al. Hypoxia induces major on cell cycle kinetics and protein expression in *Drosophila melanogaster* embryos. **American Journal of Physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology**, v.288, p.511-521, 2005.

DOVERSKOG, M. et al. Physiology of cultured animal cells. **Journal of Biotechnology**, v.59, p.103-115, 1997.

DOVERSKOG, M.; HAN, L.; HÄAGGSTRÖM, L. Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. **Cytotechnology**, v. 26, p.91–102, 1998.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**, Canadá: John Wiley & Sons, 1998.

DREWS, M.; PAALME, T.; VILU, R. The growth and nutrient utilization of insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p.187-198, 1995.

DREWS, M. et al. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by $^1\text{H}^{15}\text{N}$ NMR. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 23-37, 2000.

DRINGS, A. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? **Vaccine**, v. 17, p.1549–1557, 1999.

EBERHARD, U.; SCHÜGERL, K. Investigation of reactors for insect cell culture, **Develop Biol. Standard**, v. 66, p. 325-330, 1987.

ELIAS, C. B. et al. 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.

FAGAIN, C.O. **Use of stabilizing additives**. In: *Stabilizing protein function*, New York: Springer, 1997. p.70-79.

FEHON, R. G. et al. Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci notch and delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. **Cell**, v.61, p.523-534, 1990.

FERTIG, G. et al. Biotechnological aspects of the production of human pro-kallikrein using the AcNPV-baculovirus-expression system. **Cytotechnology**, v.11, p. 67-75, 1993.

FIORE, M.; DEGRASSI, F. Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell-dependent apoptosis in hamsters cells. **Experimental Cell Research**, v. 251, n.1, p. 102-110, 1999.

FOX, S.R. et al. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling. **Biotechnology Bioengineering**, v.85, p.177–184, 2004.

FRANCIS, K.M.; O'CONNOR, K.C.; SPAUDING, G.F. Cultivation of fall armyworm ovary cells in simulated microgravity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.33, p.332-336, 1997.

FREEDMAN R. Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, p. 438-441, 1984.

FUJITA, J. Cold shock response in mammalian cells. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.1, p. 243-255, 1999.

FURUKAWA, K.; OHSUYE, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α -amidating enzyme. **Journal of Cytotechnology**, v. 26, n. 2, p. 153-164, 1998.

FURUKAWA, K.; OHSUYE, K. Enhancement of productivity of recombinant-amidating enzyme by low temperature culture. **Cytotechnology**, v. 31, p. 85–94, 1999.

GETLER, F. B. et al. *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. 521- 533, 1995.

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

GOTOH, T. et al. Significant increase in recombinant protein production of a virus-infected Sf9 insect cell culture 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 Sf9 insect cells and their culture at low temperature to circumvent oxygen starvation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 71-78, 2004.

GRACE, T.D.C. Prolonged survival and growth of insect ovarian tissue in vitro conditions. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.77, p.275-282, 1959.

GUILLAUME, L.M. et al. High density insect cell homogenous perfusion culture for recombinant protein production. In: VLAK, J.M.; SCHALAEGER, E.J.; BERNARD, A.R. **Baculovirus and recombinant protein production processes**. Basel: Editiones Roche, 1992.

GUPTA, P., K et al. Immunogenic and Antigenic Properties of Recombinant Soluble Glycoprotein of Rabies Virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 207 - 214, 2005.

GUY, E. **Drosophila cell in culture**. San Diego: Academy Press, 1997.

HENDRICK, V. et al. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: cell cycle phases analysis. **Cytotechnology**, v,36, p.71-83, 2001.

HINK, W.F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Nature**, v.226, p.466-467, 1970.

HINK, W.F.; STRAUSS, E.M. *Invertebrate systems in vitro*, Amsterdam: Elsevier, p.27-33, 1980.

HUHTALA, A., LINKO, P.; MUTHARASAN, R. Protein response of insect cells to bioreactor environmental stresses. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 278-289, 2005.

HWA, S. S.; HYE, J. L.; HYUNG, J. C. Quantitative monitoring for secreted production of human interleukin-2 in stable insect *Drosophila* S2 cells using a green fluorescent protein fusion partner. **Biotechnology Progress**, v.19, p.152-157, 2003.

HWA, S. S.; HYUNG, J. C. Facile and statistical optimization of transfection conditions for secretion of foreign proteins from insect *Drosophila* S2 cells using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Progress**, v.18, p. 1187-1194, 2002.

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

IKONOMOU, I.; BASTIN, Y.J.; SCHNEIDER, S.N. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. **In Vitro Cell Development Biology Animal**, v. 37, p. 549-559, 2001.

INLOW, D.; HARANO, D.; MAIORELLA, B. Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. **Presented at the American Chemical Society National Meeting**. New Orleans: Louisiana, 1987.

Invitrogen life technologies. **Drosophila Expression System** – versão H, 2003.

IRIE, T.; KANAKANAMAGE, P.J.; KAWAI, A. Two different conformations of rabies virus glycoprotein taken under neutral pH conditions. **Microbiology and Immunology**, v. 50 , n.6, p.435-446, 2006.

IVEY-HOYLE, M. Recombinant gene expression in cultures *Drosophila melanogaster* cells. **Current Opinion Biotechnology**, v.2, p. 704-707, 1991.

IVEY-HOYLE, M.; ROSENBERG, M. Rev-dependent expression of human immunodeficiency virus type 1 gp160 in *Drosophila melanogaster* cells. **Molecular and Cellular Biology**, v.10, p.6152-6159, 1990.

JAIN, D. et al. Large-scale recombinant protein production using the insect cell-baculovirus expression vector system: Antistatin and β -adrenergic receptor. In: SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; MEIGNIER, B. (Ed.). **Production of biologicals from animal cells in culture**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.345-351.

JENTOFT, N. Why are proteins O-glycosylated? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, p. 291-294, 1990.

JOHANSEN, H. et al. Regulated expression at high copy number allows production of a growth inhibitory oncogene product in *Drosophila* Schneider cells. **Genes and Development**, v.3, p.882-889, 1989.

JOHANSON, K. et al. 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. et al. On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 36 - 48, 1996.

KANKANAMAGE, P.J. et al. Further characterization of the rabies virus glycoprotein produced by virus-infected and G cDNA-transfected cells using a monoclonal antibody, #1-30-44, which recognizes an acid-sensitive epitope. **Microbiology and Immunology**, v.47, n.5, p. 337-349, 2003.

KAUFMANN, H. et al. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. **Biotechnology Bioengineering**, v.63, p.573-582, 1999.

KIRKPATRICK, R. B. et al. 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.

KIM, J.H.; KIM, E.J.; PARK, T.H. Fed-batch culture of insect cells with exponential feeding of amino acid and yeastolate solution. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.367-370, 2000.

KIOUKIA, N. et al. Influence of agitation and sparging on the growth rate and infection of insect cells in bioreactors and a comparison with hybridoma culture. **Biotechnology Progress**, v. 12, p. 779-785, 1996.

KLAASSEN, C.H.W. et al. Large-scale production and purification of functional recombinant bovine rhodopsin with the use of the baculovirus expression system. **Biochemical Journal**, v.342, p. 293-300, 1999.

KRANTZ, D. E.; ZIPURSKY, S. L. *Drosophila* Choptin, a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. **EMBO Journal**, v. 9, p. 1969-1977, 1990.

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

LEE, S.H.; PARK, T.H. Growth limiting factors influencing high density culture of insect cells in Grace's medium. **Biotechnology Letters**, v.16, n. 4, p.327-332, 1994.

LEGRAND, C. et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. **Journal of Biotechnology**, v.25, p.231-243, 1992.

LEHR, R. V. et al. Modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in *Drosophila* S2 cells. **Protein Expression Purification**, v.19, p.362-368, 2000.

LENGYEL, L.; SPRADLING, A.; RENMAN, S. Methods with insect cells in suspension culture III, *Drosophila melanogaster*, **Methods in Cell Biology**, v. 10, p. 195-208, 1975.

LI, B. et al. Expression of human dopamine b-hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells. **Biochemical Journal**, v.313, p.57-64, 1996.

LI, J. et al. Understanding the enhanced effect of dimethyl sulfoxide on hepatitis B surface antigen in the culture of Chinese hamster ovary cells on the basis of proteome analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 372-380, 2006.

LIM, H.J.; CHA, H.J. Observation and modeling of induction effect on human transferrin production from stably transfected *Drosophila* S2 cells culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 208-214, 2006.

LIU, J. et al. Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. **International Journal of Immunopharmacology**, v.1, n.1, p.63-74, 2001.

LU, M. et al. A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.30724-30728, 1997.

MAILLARD, A.P.; GAUDIN, Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. **Journal of General Virology**, v.83, p.1465–1476, 2002.

MAIORELLA, B. Et al. Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. **Bio/Technology**, v.6, p.1406-1410, 1988.

MARQUES, F. H. **Influência do oxigênio dissolvido na produção de poliedro de baculovirus por células de inseto em biorreator**. 2005. 102 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2005.

McCARROLL, L.; KING, L.A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.590-594, 1997.

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.

MERCHUK, J.C. **Why use airlift bioreactors?**. *Tibtech*, v.8, p.66, 1990.

MERCHUK, J.C. et al. A method for evaluation of mass transfer coefficients in the different regions of airlift reactors. **Chemical Engineering Science**, v. 47, p. 3517, 1992.

MERCHUK, J.C. et al. Concentric-tube Airlift reactors: effects of geometrical design performance. **AIChE Journal**, v. 40, p. 1105, 1994.

MILLAR, N. S.; BAYLIS, H. A.; REAPER, C.; BUNTING, R.; MASON, W. T.; SATTELLE, D. B. Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. **Journal of Experimental Biology**, v.198, p.1843-1850, 1995.

MILLAR, N. S.; BUCKINGHAM, S. D.; SATTELLE, D. B. Stable expression of a functional homo-oligomeric *Drosophila* GABA receptor in a *Drosophila* cell line. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v.258, p.307-314, 1994.

MILLER, L.K. Baculoviruses: high level expression in insect cells. **Current Opinion of Gene Development**, v.3, p.97-101, 1993.

MITCHELL-LOGEAN, C. MURHAMMER, D.W. Bioreactor headspace purging reduces dissolved carbon dioxide accumulation in insect cell cultures and enhances cell growth. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 875-877, 1997.

MOORE, A. et al. Effect of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. **Cytotechnology**, v.23, p. 47-54, 1997.

MURHAMMER, D.W.; GOOCHEE, C.F. Scaleup of insect cell cultures: protective effects of pluronic F-68. **Bio/Technology**, v. 6, p. 1411 – 1418, 1988.

MUTHARASAN, R. **Bioreactors: Engineering biotechnology gateway project**. Philadelphia: Drexel University, p. 1-44, 1996.

NILSEN, S. L., e CASTELLINO, F. J. Expression of human plasminogen in *Drosophila* Schneider S2 cells. **Protein Exp. Purification**, v.16, p.136-143, 1999.

O'CONNOR, K.C. et al. Prolonged shearing of insect cells in a couette bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p.600–608, 2002.

ÖHMAN, L.; LJUNGGREN, J.; HÄGGSTROM, L. Introduction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed-batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 1-8, 1995.

ÖHMAN, L. et al. Glutamine is not an essential amino acid for Sf9 Insect Cell. **Biotechnology Letters**. v.18, p.756-770, 1996.

OHSAKA, Y. et al. Phosphorylation of c-Jun-N-terminal kinase in human hepatoblastoma cells is transiently increased by cold exposure and further enhanced by subsequent warm incubation of the cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.12, p.111–118, 2002.

OVERGAARDE, J. et al. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v.53, p.1218-1232, 2007.

PALOMARES, L.A.; LÓPEZ, S.; RAMÍREZ, O.T. Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cell cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 87-93, 2004.

PARK, J.H.; LEE, J.M.; CHUNG, I.S. Production of recombinant endostatin from stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.729-733, 1999.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C.C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.340–347, 1997.

PFEIFER, T.A. Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.518-521, 1998.

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.

REAVY, B. et al. Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression system. **Protein Exp. Purification**, v.18, p.221-228, 2000.

REUVENEY, S. et al. Carbohydrate metabolism in insect cell cultures during cell growth and recombinant protein production. **Biochemical Engineering**, New York, v. 1, p. 230-237, 1992.

RHIEL, M.; MITCHELL-LOEGEAN, C.M.; MURHAMMER, D. W. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High five) and *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cell line metabolism in suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, p. 909-920, 1997.

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.

RICE, J.W. et al. A comparison of large scale Sf9 insect cell growth and protein production: stirred vessel vs. airlift. **Biotechniques**, v.15, p.1052-1059, 1993.

RODRIGUEZ, J. et al. Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions. **Biotechnology Progress**, v.21, p. 22 – 30, 2005.

RÖSSLER, B.; LÜBBEN, H.; KRETZMER, G. Temperature: a simple parameter for process optimization in fed-batch cultures of recombinant Chinese hamster ovary cells. **Enzyme Microbial Technology**, v.18, p. 423-427, 1996.

SAKAI, M. et al. Studies on the structures required for structural and functional maturation of rabies virus glycoprotein (G) in G cDNA- transfected cells. **Microbiology and Immunology**, v.48, n.11, p.853-864, 2004.

SAKAMOTO, S. et al. 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. et al. A structured, dynamic model for animal cell culture: application to baculovirus/insect cell systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 219 - 229, 1999.

SCHLAEGER, E.J. Medium Design for insect cell culture. **Cytotechnology**, v.20, p.57-70, 1996.

SCHATZ, S.M. et al. Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. **Biotechnology and Bioengineering**, v.84, p.433–438, 2003.

SCHMID, G. Insect cell cultivation: growth and kinetics. **Cytotechnology**, v.20, p. 43-56, 1996.

SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **Journal Embryology, Express Morphology**, v. 27, p. 363 – 365, 1972.

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

SCOTT, T.R.I.; BLANCHARD, J.H.; FERGUSON, C.H.R. Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.14, p. 798-804, 1992.

SETHURAMAN, N.; STADHEIM, T.A. Challenges in therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.341–346, 2006.

SHAH, G.; CROSSET, B.; HALE, R.S. Growth and infection of Sf-9 cells for production of EGFR-Tk at 30 L scale. In: WORKSHOP ON BACULOVIRUS AND RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION PROCESS. J.M. Vlask, J. Schalanger and A.R. Bernard (Ed.), v. 216, 1992.

SHARMA, V.K.; KALONIA, D.S. Temperature- and pH- induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.11, p. 1721-1729, 2003.

SIEGEL, M.; MERCHUK, J.C. **Biorreactor and biotransformations**. In: MOODY, G.W. and BAKER, P.B. (Ed.). London: Elsevier, p. 350, 1987.

SILVA, C. S. **Avaliação diferencial de fatores fisiológicos e cinéticos em cultivos de linhagens de células selvagem e recombinante de *Drosophila melanogaster* S2**. 2006. 126 p. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. **Cytotechnology**, v. 30, p.149-158, 1999.

SONDERGAARD, L. *Drosophila* cells can be grown to high cell densities in a bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v.10, p.161-166, 1996.

SONNA, L.A. et al. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1725–1742, 2002.

SPRADLING, A. et al. Methods with insect cells in suspension culture I: *Aedes albopictus*, **Methods in Cell Biology**, v. 10, p. 185-194, 1975.

STAVROULAKIS, D.A. et al. Kinetic data for the Bm-5 insect cell line in repeated-batch suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, p.116–126, 1991.

STOCKDALE, H.; GARDINER, G.R. Utilization of some sugars by a line of *Trichoplusia Ni* cells. **Invertebrate Tissue Culture**. Londres: Academic Press. 1976. p. 267-274.

SUGIURA, T.; AMANN, E. Properties of two insect cell lines useful for the baculovirus expression system in serum-free culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.51, p.494-499, 1996.

SUMMERS, M.D.; SMITH, G. E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure. **Texas Agric. Experiment Station**, v.9, p.1-56, 1987.

SWIECH, K. **Caracterização fisiológica e cinética de células de *Drosophila melanogaster* S2 visando cultivos em biorreator para produção de vacina anti-rábica recombinante**. 2007. 221 p. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SWIECH, K. et al. Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies virus glycoprotein gene. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 2007. No prelo.

TATICEK, R.A.; SHULER, M.L. Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, p.142–152, 1997.

TOM, R.L. et al. Improved yields of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor produced using the baculovirus expression system by medium replacement following infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.53–58, 1995.

TORFS, H. et al. Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable *Drosophila* Schneider 2 cell line. **Journal of Neurochemistry**, n.74, p.2182-2189, 2000.

TOTA, M. R. et al. Interaction of [fluorescein-Trp25] glucagon with human glucagon receptor expressed in *Drosophila* Schneider 2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.26466-26472, 1995.

TRAMPER, J.; WILLIAMS, J.; JOUSTRA, D. Shear sensitivity of insect cells in suspension. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 8, p.33-36, 1986.

VALLE, M.A. et al. Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. **Cytotechnology**, v.35, p.127-135, 2001.

VAUGHN, J.L.; FAN, F. Differential requirements of two insect cell lines for growth in serum-free medium, in vitro. **Cellular and developmental biology**, v.33, p.479-482, 1997.

VAUGHN, J.; USDA, A.R.S.; MARYLAND, B. **Insect cell culture, protein expression**. In: Encyclopedia of bioprocess technology. New York, v.1-5, 1999. p.1444-1457.

VIEIRA, B.B. Disponível em: <<http://www.vacinas.org.br>>. Acesso em: 24 out. 2007.

WALLNY, H. J.; SOLLAMI, G.; KARJALAINEN, K. Soluble mouse major histocompatibility complex class II molecules produced in *Drosophila* cells. **European Journal of Immunology**, v.25, p.1262-1266, 1995.

WANG, D.I.C. et al. **Fermentation and enzyme technology**. New York: John Wiley, 1979.

WANG, W.C.; ZINN, K.; BJORKMAN, P. J. Expression and structural studies of fasciclin I, an insect cell adhesion molecule. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p.1448-1455,1993.

WANG, M-Y.; KWONG, S.; BENTLEY, W.E. Effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on insect cell baculovirus protein expression: Study on epoxide hydrolase production. **Biotechnology Progress**, v. 9, p.355-361, 1993.

WANG, M-Y.; DOONG, S-R. A pH-based fed-batch process for the production of a chimeric recombinant infectious bursal disease virus (IBDV) structural protein (rVP2H) in insect cells. **Process Biochemistry**, v.35, p.877–884, 2000.

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

WEBER, W. et al. Catching the wave: the BEVS and the biowave. In: Weber, W. et al. **Animal Cell Technology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. p.335-337.

WEIDEMANN, R.; LUDWIG, A.; KRETZMER, G. Low temperature cultivation step towards process optimisation. **Cytotechnology**, v.15, p. 111–116, 1994.

WEISS, S.A. et al. Insect cells as substrates for biologicals. **Develop Biol. Standard**, v. 70, p. 271-279, 1988.

WOJCZYK, B.S. et al. The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. **Glycobiology**, v.8, n.2, p.121–130, 1998.

WU, J. et al. Adaptation of insect cells to suspension culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, p. 90-93, 1990.

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.

YANG, J. et al. Rational scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p.696–706, 1996.

YOKOMIZO, A.Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v.2, p.102–109, 2007.

YOON, S.K.; KIM, S.H.; LEE, G.M. Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of Anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology Progress**, v.19, p. 1383-1386, 2003a.

YOON, S.K.; SONG, J.Y.; LEE, G.M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.82, p.289–298, 2003b.

YOON, S.K.; HWANG, S.O.; LEE, G.M. Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: clonal variation . **Biotechnology Progress**, v.20, p. 1683-1688, 2004.

YOSHIDA, H. et al. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. **Neurobiological Diseases**, v.10, n.2, p. 88-99, 2002.

ZHANG, J. et al. Optimum infection conditions for recombinant protein production in insect cell (Bm5) suspension culture. **Biotechnology Progress**, v.10, p.636-643, 1994.

ZHANG, J. et al. High-density perfusion culture of insect cells with a biosep ultrasonic filter. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 351 - 359, 1998.

ZHANG, F. et al. The effect of dissolved oxygen (DO) concentration on the glycosylation of recombinant protein produced by the insect cell-baculovirus expression system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 219-224, 2002.

APÊNDICE A

Valores experimentais referentes aos experimentos realizados.

Tabela A.1. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K com e sem a adição de aminoácidos no meio de cultura Sf-900 II. Em frasco schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, incubados em shaker a 28°C e 100 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Controle					Suplementação aa				
Tempo (dias)	X (10^6 cel.mL ⁻¹)	Viab. (%)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL ⁻¹)	Tempo (dias)	X (10^6 cel.mL ⁻¹)	Viab. (%)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL ⁻¹)
0	0,77	99,05	0	31,21	0	0,82	98,55	0	15,34
0,92	1,39	99,21	0,910	45,18	0,92	1,55	99,40	0,910	55,76
1,31	1,71	99,56	1,920	27,51	1,31	2,04	99,40	1,920	20,66
1,93	2,72	99,20	2,950	89,73	1,93	3,36	97,60	2,950	146,87
2,31	4,14	97,43	3,920	297,27	2,31	5,15	98,50	3,920	525,32
2,96	8,09	98,30	4,910	1253,21	2,96	10,10	98,83	4,910	1248,63
3,42	12,30	98,48	5,960	1111,56	3,42	19,30	98,54	5,960	643,87
3,93	24,70	98,43	6,930	599,99	3,93	25,00	98,20	6,930	200,47
4,30	23,30	97,80			4,30	27,40	98,85		
4,92	23,40	98,29			4,92	23,90	98,37		
5,97	23,80	98,00			5,97	24,10	98,19		
6,94	24,80	97,74			6,94	24,60	97,00		
7,93	24,20	96,43			7,93	25,60	95,80		
8,97	24,50	93,60			8,97	25,50	91,95		

Consumo de substratos e formação de subprodutos

Controle			Suplementação aa		
Tempo (dias)	Glicose (g.L ⁻¹)	Lactato (g.L ⁻¹)	Tempo (dias)	Glicose (g.L ⁻¹)	Lactato (g.L ⁻¹)
0	13,722	0,033	0	11,711	0,013
0,916	12,921	0,012	0,916	13,815	0,014
1,927	9,798	0,000	1,927	13,225	0,010
4,302	8,004	0,050	4,302	8,345	0,012
5,968	5,212	0,077	5,968	4,921	0,120
7,927	4,298	0,146	7,927	3,962	0,205

Consumo aminoácidos e produção de amônio – Controle

Tempo (dias)	Serina (g.L⁻¹)	Glutamina (g.L⁻¹)	Prolina (g.L⁻¹)	Cisteína (g.L⁻¹)	Amônio (mg.L⁻¹)	Alanina (g.L⁻¹)
0	0,800	6,485	1,000	0,100	146,964	0,579
1,312	0,638	--	1,124	0,117	139,512	0,774
2,312	0,081	5,802	1,007	0,077	157,250	0,898
2,958	0,553	4,613	0,859	0,058	176,324	0,891
3,416	0,503	4,380	0,941	0,047	194,649	1,103
3,928	0,378	3,449	0,105	0,036	243,463	1,267
4,916	0,200	1,036	1,032	0,015	284,598	2,308
6,937	0,136	0,000	0,915	0,014	361,570	2,800
8,968	0,162	0,000	1,09	0,008	345,027	3,366

Consumo aminoácidos e produção de amônio – Suplementação aa

Tempo (dias)	Serina (g.L⁻¹)	Glutamina (g.L⁻¹)	Prolina (g.L⁻¹)	Cisteína (g.L⁻¹)	Amônio (mg.L⁻¹)	Alanina (g.L⁻¹)
0	0,961	10,868	2,867	0,128	161,396	0,534
1,312	0,970	11,741	3,056	0,125	155,623	0,756
2,312	0,440	--	1,962	0,076	167,384	0,666
2,958	0,716	9,055	3,148	0,085	183,820	1,373
3,416	0,501	6,576	2,637	0,059	176,325	1,344
3,928	0,312	4,224	2,209	0,034	228,725	1,352
4,916	0,267	2,472	2,762	0,024	296,697	2,671
6,937	0,230	0,974	2,971	0,019	348,637	3,710
8,968	0,207	0,333	2,828	0,007	359,694	3,805

Tabela A.2. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 16°C em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em frasco Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10^6 cel.mL⁻¹)	Viab. (%)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL⁻¹)
0,000	0,519	96,820	0,000	10,222
0,917	0,666	95,150	0,917	7,068
1,250	0,675	95,190	2,920	30,966
1,906	0,657	96,770	7,958	75,149
2,236	0,652	94,730	11,917	48,240
2,920	0,593	96,060	14,917	36,329
3,250	0,634	94,360		
3,917	0,609	95,480		
4,243	0,587	95,230		
4,986	0,573	95,800		
5,222	0,485	95,030		
5,910	0,571	96,870		
6,236	0,565	97,070		
6,910	0,546	96,310		
7,240	0,603	95,980		
7,958	0,601	97,680		
8,236	0,505	96,310		
8,917	0,506	96,370		
9,350	0,528	97,740		
9,917	0,529	97,630		
10,323	0,483	95,440		
10,923	0,494	95,170		
11,323	0,451	93,490		
11,923	0,496	92,090		
12,323	0,438	93,190		
12,923	0,440	94,130		
13,923	0,369	92,560		
14,917	0,254	87,640		

Consumo de aminoácidos e produção de amônio

Tempo (dias)	Serina (g.L ⁻¹)	Glutamina (g.L ⁻¹)	Prolina (g.L ⁻¹)	Cisteína (g.L ⁻¹)	Amônio (mg.L ⁻¹)	Alanina (g.L ⁻¹)
0,000	0,503	2,792	2,426	0,062	171,764	0,367
0,917	0,544	3,119	2,751	0,080	170,543	0,600
2,920	0,559	3,009	2,705	0,076	165,742	0,582
4,986	0,469	2,521	2,235	0,058	142,670	0,486
7,958	0,486	2,556	2,296	0,056	174,234	0,682
11,917	0,507	2,682	2,441	0,065	174,234	0,680
14,917	0,430	2,194	2,233	0,053	146,802	0,694

Tabela A.3. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 20°C em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em frasco Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	Viab. (%)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL ⁻¹)
0,000	0,566	96,840	0,000	7,246
0,917	0,831	97,600	0,917	14,001
1,250	0,840	98,120	1,906	4,650
1,906	1,270	98,720	2,920	40,632
2,236	1,206	95,850	3,917	46,959
2,920	2,000	95,310	4,986	64,903
3,250	2,260	95,240	5,908	274,027
3,917	3,070	96,520	6,910	418,606
4,243	3,210	97,770	7,958	917,808
4,986	4,600	97,280	8,917	640,042
5,222	5,860	94,500	9,917	1447,305
5,910	8,190	99,020	10,923	2709,014
6,236	9,513	98,450	11,923	2714,823
6,910	11,140	98,480	12,923	2914,255
7,240	10,800	98,280	14,917	2973,066
7,958	14,400	98,820		
8,236	18,500	98,530		
8,917	13,310	97,960		
9,350	12,610	98,510		
9,917	16,400	98,020		
10,323	17,000	98,350		
10,923	16,800	96,230		

Continuação Tabela A.3. – Crescimento e Produção GPV

11,323	16,900	98,070		
11,923	16,900	97,050		
12,323	17,830	95,790		
12,923	17,800	97,750		
13,923	18,700	94,530		
14,917	16,600	94,440		

Consumo de aminoácidos e produção de amônio

Tempo (dias)	Serina (g.L ⁻¹)	Glutamina (g.L ⁻¹)	Prolina (g.L ⁻¹)	Cisteína (g.L ⁻¹)	Amônio (mg.L ⁻¹)	Alanina (g.L ⁻¹)
0,000	0,825	2,735	2,830	0,116	91,053	0,467
1,906	0,794	2,523	2,706	0,102	95,419	0,634
3,250	0,905	2,815	2,973	0,114	135,929	0,987
4,986	0,677	2,167	2,355	0,079	146,202	1,332
5,910	0,536	1,820	1,967	0,065	176,325	1,523
6,910	0,460	1,569	1,849	0,057	208,273	2,486
7,958	0,288	1,013	1,329	0,045	261,862	2,847
9,917	0,112	0,306	0,798	0,010	350,456	3,956
11,923	0,007	0,000	0,455	0,000	403,323	4,156
13,923	0,000	0,000	0,224	0,000	452,244	3,153
14,917	0,000	0,000	0,161	0,000	614,771	2,545

Tabela A.4. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 24°C em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em frasco Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	Viab. (%)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL ⁻¹)
0,000	0,5950	99,650	0,000	25,706
0,906	1,090	99,750	0,906	49,427
1,590	2,480	98,990	1,590	88,571
1,916	2,990	99,440	1,916	63,453
2,593	5,460	99,320	2,593	162,292
2,927	7,930	99,670	2,927	150,127
3,604	14,300	99,700	3,604	297,585
3,885	14,900	99,480	3,885	177,428
4,604	22,500	99,820	4,604	332,844

Continuação Tabela A.4. – Crescimento e Produção de GPV

4,906	23,600	99,520	4,906	480,340
5,614	24,300	99,520	5,614	214,989
5,927	24,100	99,560	5,927	135,723
6,604	22,600	99,350	6,604	141,841
6,910	25,400	99,160	6,910	162,160
7,583	22,800	99,460	7,583	192,317
7,937	22,900	99,500	7,937	146,267
8,583	22,000	99,020	8,583	226,523
8,916	22,500	99,580	8,916	233,360
9,576	19,900	99,260	9,576	244,144
9,916	15,000	98,330	9,916	206,989

Consumo de aminoácidos e produção de amônio

Tempo (dias)	Serina (g.L⁻¹)	Glutamina (g.L⁻¹)	Prolina (g.L⁻¹)	Cisteína (g.L⁻¹)	Amônio (mg.L⁻¹)	Alanina (g.L⁻¹)
0,000	0,412	2,616	2,078	0,045	106,055	0,373
0,906	0,391	2,451	1,950	0,046	103,023	0,427
1,590	0,378	2,292	1,933	0,042	119,106	0,517
2,594	0,330	2,043	1,703	0,030	71,686	0,773
3,604	0,229	1,640	1,463	0,013	117,391	1,303
3,885	0,182	1,409	1,285	0,008	161,523	1,483
4,906	0,013	0,480	0,449	0,000	176,211	1,773
5,615	0,012	0,364	0,244	0,000	228,788	2,315
6,604	0,000	0,153	0,094	0,000	74,874	2,316
6,910	0,000	0,184	0,106	0,000	245,999	2,325
7,583	0,000	0,111	0,106	0,000	348,444	2,330
8,583	0,000	0,136	0,052	0,000	374,656	2,282
8,917	0,000	0,080	0,044	0,000	699,090	1,880
9,917	0,000	0,104	0,033	0,000	385,685	1,944

Tabela A.5. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 28°C em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em frasco Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10^6 cel.mL⁻¹)	Viab. (%)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL⁻¹)
0,000	0,523	97,110	0,000	5,580
0,917	0,886	97,850	0,917	21,789
1,250	1,150	97,610	1,906	38,154
1,906	2,271	93,710	2,920	94,964
2,236	3,353	96,420	3,917	149,327
2,920	5,462	98,620	4,986	421,305
3,250	7,210	96,250	5,908	624,914
3,917	11,400	98,790	6,910	569,732
4,243	16,370	95,460	7,958	584,347
4,986	17,180	99,060	8,917	1355,483
5,222	19,400	97,790	10,923	1404,903
5,910	18,700	98,790	11,923	1341,887
6,236	20,770	98,190		
6,910	20,390	97,430		
7,240	20,680	98,330		
7,958	21,300	98,920		
8,236	19,410	98,020		
8,917	19,100	98,460		
9,350	20,420	95,530		
9,917	18,800	94,850		
10,323	16,900	96,560		
10,923	16,700	97,000		
11,323	16,500	93,410		
11,923	11,200	93,300		
12,323	10,120	91,850		

Consumo de aminoácidos e produção de amônio

Tempo (dias)	Serina (g.L⁻¹)	Glutamina (g.L⁻¹)	Prolina (g.L⁻¹)	Cisteína (g.L⁻¹)	Amônio (mg.L⁻¹)
0,000	0,397	2,316	2,253	0,051	363,440
0,917	0,422	2,332	2,079	0,039	306,220
1,906	0,456	2,406	2,008	0,053	328,877
2,920	0,365	1,921	2,114	0,030	443,847
3,917	0,318	1,819	2,005	0,024	629,699
4,986	0,141	0,790	1,141	0,011	855,920
5,908	0,077	0,276	1,135	0,004	1075,556
6,910	0,078	0,320	0,421	0,001	1060,311
7,958	0,032	0,060	0,193	0,000	1037,847
8,917	0,009	0,025	0,000	0,000	1130,663
9,917	0,007	0,006	0,000	0,000	1015,858
10,923	0,029	0,181	0,000	0,000	1075,556
11,923	0,006	0,067	0,000	0,000	1267,457

Tabela A.6. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 34°C em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em frasco Schott de 250 mL com 30 mL de volume de trabalho, pH 6,2 e 100 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10⁶ cel.mL⁻¹)	Viab. (%)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL⁻¹)
0,000	0,483	99,000	0,000	10,090
0,948	0,806	99,230	1,052	13,760
1,677	1,170	99,530	1,677	12,184
2,031	1,190	99,600	2,958	9,418
2,677	1,136	99,260	4,740	10,506
2,958	0,974	99,170	6,184	7,009
3,705	1,200	99,240	7,750	4,132
4,010	1,138	99,620		
4,740	1,087	98,840		
5,018	1,106	98,930		
5,729	0,988	98,800		
6,184	0,964	98,630		
6,760	0,963	98,850		
7,156	0,919	98,630		
7,750	0,903	99,040		

Consumo de aminoácidos e produção de amônio

Tempo (dias)	Serina (g.L ⁻¹)	Glutamina (g.L ⁻¹)	Prolina (g.L ⁻¹)	Cisteína (g.L ⁻¹)	Amônio (mg.L ⁻¹)	Alanina (g.L ⁻¹)
0,000	0,456	3,046	2,314	0,051	217,387	0,374
1,052	0,523	3,437	2,445	0,067	220,512	0,666
1,677	0,416	2,440	2,132	0,036	236,828	0,723
2,958	0,422	2,062	1,907	0,030	258,008	1,234
4,740	0,512	2,116	2,129	0,041	283,096	2,084
6,184	0,538	2,028	2,330	0,056	289,223	2,476
7,750	0,436	1,606	1,936	0,040	306,220	2,049

Tabela A.7. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 28°C (Bio 1) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em batelada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	Viab. (%)	Tempo LDH (dias)	X _{LDH} (10 ⁶ cel.mL ⁻¹)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL ⁻¹)
0,000	0,626	98,840	0,000	0,000	0,000	1,232
0,889	2,310	98,870	1,875	0,000	0,889	2,624
1,229	3,600	98,210	2,833	0,330	1,229	10,741
1,875	10,000	97,840	4,840	0,342	2,191	40,066
2,191	11,320	98,120	5,844	0,274	2,833	42,006
2,833	17,700	98,870	6,854	0,160	3,170	56,371
3,170	21,220	98,990	7,844	0,380	3,882	40,592
3,882	22,900	98,060	8,854	0,307	4,236	83,467
4,236	25,700	96,680			4,840	107,171
4,840	23,400	96,350			5,198	121,108
5,198	24,600	97,620			5,844	87,278
5,844	23,600	97,710			6,191	83,744
6,191	23,000	96,950			6,854	117,174
6,854	23,200	94,150			7,177	112,515
7,177	22,500	96,910			7,844	149,976
7,844	24,700	97,300			9,125	145,495
8,248	25,020	96,700				
8,854	25,200	96,670				
9,125	24,300	95,790				

Consumo de substratos e produção de amônio

Tempo (dias)	Glicose (g.L⁻¹)	Lactato (g.L⁻¹)	Amônio (mg.L⁻¹)
0,000	16,560	0,000	21,350
0,889	12,590	0,000	21,812
1,229	13,120	0,000	36,728
1,875	12,470	0,000	49,216
2,191	11,720	0,000	55,170
2,833	9,460	0,000	61,845
3,170	8,880	0,000	89,003
3,882	6,710	0,033	110,256
4,236	5,470	0,041	119,262
4,840	3,160	0,081	154,207
5,198	2,410	0,120	310,387
5,844	0,920	0,165	384,506
6,191	0,870	0,124	412,955
6,854	0,820	0,240	537,778
7,177	0,820	0,243	629,221
7,844	0,167	0,039	690,404
8,248	0,912	0,048	--
8,854	0,835	0,056	855,270
9,125	0,799	0,063	1022,358

Consumo de aminoácidos e formação de subprodutos

Tempo (dias)	Serina (g.L⁻¹)	Glutamina (g.L⁻¹)	Prolina (g.L⁻¹)	Cisteína (g.L⁻¹)	Alanina (g.L⁻¹)
0,000	0,494	3,152	2,380	0,059	0,412
0,889	0,426	2,723	2,292	0,045	0,582
1,229	0,455	2,429	2,057	0,045	0,713
1,875	0,261	--	--	0,019	0,772
2,191	0,347	2,209	2,098	0,024	1,641
2,833	0,249	1,527	1,657	0,010	2,318
3,170	0,187	1,075	1,409	0,006	2,715
3,882	0,076	0,383	0,953	0,001	2,496
4,236	0,046	0,241	0,915	0,001	2,880
4,840	0,009	0,131	0,872	0,000	3,679
5,198	0,006	0,112	0,909	0,000	3,481
5,844	0,006	0,117	0,894	0,000	3,608
6,191	0,006	0,156	0,595	0,000	3,891
6,854	0,005	0,191	0,925	0,000	3,302
7,177	0,004	0,177	0,695	0,000	2,943
7,844	0,004	0,146	0,760	0,000	1,770
8,248	0,005	0,158	0,899	0,000	1,399
8,854	0,005	0,143	--	0,000	0,891
9,125	0,002	0,077	0,445	0,000	0,622

Tabela A.8. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 20°C (Bio 2) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em batelada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10^6 cel.mL⁻¹)	Viab. (%)	Tempo LDH (dias)	X_{LDH} (10^6 cel.mL⁻¹)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL⁻¹)
0,000	0,735	99,510	0,000	0,000	0,000	4,179
0,688	1,083	99,720	1,021	0,000	1,021	8,849
1,021	1,180	99,600	1,729	0,000	2,042	9,825
1,729	2,040	99,860	2,736	0,000	3,055	90,518
2,042	2,207	99,090	3,708	0,000	4,042	156,283
2,736	3,693	99,150	4,708	0,000	6,042	354,136
3,055	4,828	99,260	5,722	0,000	7,031	196,409
3,708	6,827	99,410	6,719	0,031	7,708	93,068
4,042	9,000	99,580	7,708	0,106	8,031	132,376
4,708	13,310	99,530	8,729	0,101	9,056	89,369
5,042	14,500	99,880	9,719	0,101	10,042	91,166
5,722	18,460	99,760	10,719	0,366	10,719	103,881
6,042	19,460	99,680	11,708	0,668	11,708	134,762
6,719	22,000	99,200	12,708	1,470	12,708	118,114
7,031	25,270	99,400	13,708	1,315	13,708	125,774
7,708	27,200	99,770	14,708	1,468	14,708	73,836
8,031	26,900	98,980	15,708	2,195		
8,729	24,900	99,230				
9,056	24,900	99,620				
9,719	24,500	98,930				
10,042	25,000	98,950				
10,719	24,600	99,520				
11,024	27,100	98,790				
11,708	29,000	99,130				
12,021	29,140	98,800				
12,708	29,000	98,660				
13,063	29,400	98,670				
13,708	29,700	98,600				
14,021	26,900	98,100				
14,708	26,100	98,410				
15,000	24,060	98,440				
15,708	23,100	98,220				
16,729	19,510	98,080				

Consumo de substratos e produção de amônio

Tempo (dias)	Glicose (g.L⁻¹)	Lactato (g.L⁻¹)	Amônio (mg.L⁻¹)
0,000	10,961	0,000	96,962
1,021	10,395	0,000	92,897
2,042	10,249	0,000	80,538
3,055	9,673	0,000	89,640
4,042	9,562	0,000	164,438
5,042	9,952	0,000	199,390
6,042	8,361	0,000	293,159
7,031	6,555	0,013	376,360
7,708	6,249	0,021	--
8,031	5,350	0,022	421,894
9,056	3,624	0,027	472,937
10,042	2,147	0,031	511,568
10,719	1,666	0,041	541,631
11,708	1,220	0,054	581,705
12,708	1,064	0,064	642,840
13,708	0,876	0,066	768,428
14,708	0,672	0,093	736,212
15,708	0,831	0,080	685,493
16,729	0,488	0,051	796,348

Consumo de aminoácidos e formação de subprodutos

Tempo (dias)	Serina (g.L⁻¹)	Glutamina (g.L⁻¹)	Prolina (g.L⁻¹)	Cisteína (g.L⁻¹)	Asparagina (g.L⁻¹)	Alanina (g.L⁻¹)
0,000	0,490	3,257	2,218	0,051	1,564	0,466
1,021	0,489	3,453	2,132	0,047	1,671	0,449
2,042	0,392	2,535	1,813	0,036	1,302	0,707
3,055	0,387	2,584	1,672	0,028	1,346	0,622
4,042	0,473	--	2,227	0,041	1,890	1,237
5,042	0,353	2,758	2,331	0,013	1,789	1,680
6,042	0,133	1,736	1,921	0,000	1,423	1,915
7,031	0,000	1,226	1,579	0,000	1,364	2,769
7,708	0,000	1,167	1,067	0,000	1,185	3,034
8,031	0,000	0,597	0,468	0,000	0,562	--
9,056	0,000	0,945	0,531	0,000	0,758	2,629
10,042	0,000	1,267	0,513	0,000	0,801	3,365
10,719	0,000	1,393	0,456	0,000	0,714	2,952
11,708	0,000	1,305	0,249	0,000	0,569	2,815
12,708	0,000	1,587	0,234	0,000	0,708	3,365
13,708	0,000	1,317	0,233	0,000	0,643	3,275
14,708	0,000	1,059	0,207	0,000	0,528	2,789
15,708	0,000	0,815	0,205	0,000	0,444	2,633
16,729	0,000	0,841	0,151	0,000	0,450	2,603

Tabela A.9. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K em três diferentes temperaturas, 20, 18 e 16°C (Bio 3) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em batelada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10^6 cel.mL ⁻¹)	Viab. (%)	Tempo LDH (dias)	X _{LDH} (10^6 cel.mL ⁻¹)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL ⁻¹)
0,000	0,693	99,660	0,000	0,000	0,000	9,533
0,941	1,144	99,940	0,941	0,021	0,941	44,948
1,281	1,313	99,940	1,934	0,021	1,934	71,405
1,934	2,000	99,860	2,938	0,014	2,938	128,106
2,274	2,470	99,670	3,906	0,014	3,906	245,674
2,938	3,875	99,740	4,979	0,066	4,979	537,047
3,281	4,068	99,910	5,938	0,000	6,938	498,160
3,906	6,500	99,450	6,938	0,135	8,274	567,378
4,365	8,370	99,840	7,941	0,139	9,271	476,308
4,979	9,930	99,600	8,906	0,149	9,927	263,808
5,302	11,200	99,490	9,927	0,337	10,958	268,305
5,938	13,400	99,050	10,958	0,408	11,917	185,899
6,313	13,900	99,280	11,917	0,647	12,934	178,678
6,938	17,500	99,390	12,934	0,673	13,281	172,170
7,285	21,690	99,900	13,934	0,798	14,281	188,449
7,941	21,850	99,850	14,934	1,048	14,934	245,622
8,274	22,200	99,840	15,948	1,765	15,948	477,662
8,906	24,500	99,680	16,949	2,351	17,282	467,659
9,271	25,150	99,700				
9,927	28,000	99,770				
10,274	25,800	99,430				
10,958	25,800	99,450				
11,288	26,900	99,060				
11,917	28,140	99,600				
12,271	30,800	99,450				
12,934	29,200	99,170				
13,281	31,000	99,050				
13,934	28,400	99,270				
14,281	31,700	99,150				
14,934	29,820	99,200				
15,268	29,100	99,230				
15,948	28,600	98,950				
16,282	26,910	98,780				
16,948	24,700	98,250				
17,282	23,520	98,670				

Consumo de substratos e produção de amônio

Tempo (dias)	Glicose (g.L⁻¹)	Lactato (g.L⁻¹)	Amônio (mg.L⁻¹)
0,000	10,600	0,004	231,155
1,281	12,300	0,004	199,023
2,274	12,400	0,004	179,433
3,281	11,950	0,004	223,307
4,365	11,750	0,006	274,728
5,302	11,100	0,008	291,007
6,313	8,600	0,006	271,583
7,285	9,500	0,014	358,017
7,941	8,550	0,013	461,215
8,274	7,750	0,013	--
9,271	6,500	0,019	567,418
9,927	5,450	0,020	580,635
10,274	4,950	0,022	580,635
11,288	3,650	0,028	622,161
12,271	2,400	0,037	622,161
13,281	1,450	0,040	644,026
13,934	1,100	0,048	548,155
14,281	1,000	0,044	587,358
15,268	0,900	0,062	517,491
16,282	0,800	0,058	714,337
17,282	0,750	0,060	920,244

Consumo de aminoácidos e formação de subprodutos

Tempo (dias)	Serina (g.L⁻¹)	Glutamina (g.L⁻¹)	Prolina (g.L⁻¹)	Cisteína (g.L⁻¹)	Asparagina (g.L⁻¹)	Alanina (g.L⁻¹)
0,000	0,349	3,062	1,729	0,036	1,092	0,412
1,281	0,459	3,814	2,186	0,046	1,399	0,625
2,274	0,418	3,551	2,078	0,040	1,352	0,766
3,281	0,408	3,374	2,015	0,034	1,337	0,989
4,365	0,418	3,370	2,075	0,028	1,441	1,365
5,302	0,357	2,897	1,862	0,019	1,336	1,546
6,313	0,295	2,545	1,745	0,008	1,283	1,911
7,285	0,230	2,194	1,634	0,003	1,236	2,370
7,941	0,139	1,718	1,411	0,000	1,053	2,444
8,274	0,116	1,618	1,389	0,000	1,034	2,650
9,271	0,000	1,186	1,251	0,000	0,923	3,051
9,927	0,000	0,927	1,077	0,000	0,725	3,089
10,274	0,000	0,920	1,047	0,000	0,689	3,232
11,288	0,000	0,911	0,932	0,000	0,597	3,509
12,271	0,000	1,050	0,829	0,000	0,566	3,763
13,281	0,000	1,164	0,656	0,000	0,488	3,718
13,934	0,000	1,355	0,610	0,000	0,502	3,809
14,281	0,000	1,457	0,564	0,000	0,507	3,777
15,268	0,000	1,548	0,483	0,000	0,494	3,643
16,282	0,000	1,575	0,511	0,000	0,527	3,755
17,282	0,000	1,482	0,460	0,000	0,515	3,687

Tabela A.10. Valores experimentais obtidos no experimento realizado para comparação do crescimento e produção de GPV da célula S2AcGPV2K a 20°C (Bio 4) em meio de cultura Sf-900 II suplementado com aminoácidos. Os experimentos foram realizados em batelada-alimentada em biorreator, com controle de pH 6,2, OD=50% e agitação de 150 rpm.

Crescimento e Produção de GPV

Tempo (dias)	X (10^6 cel.mL ⁻¹)	Viab. (%)	Tempo LDH (dias)	X _{LDH} (10^6 cel.mL ⁻¹)	Tempo GPV (dias)	Conc. GPV (ng.mL ⁻¹)
0,000	0,614	99,664	0,000	0,000	0,000	0,885
0,823	1,070	100,000	0,823	0,000	0,823	2,062
1,156	1,150	99,881	1,854	0,059	1,156	3,240
1,854	2,320	99,763	2,844	0,047	1,854	103,612
2,177	2,690	99,492	3,847	0,073	2,177	75,653
2,844	4,150	99,312	4,851	0,184	2,844	221,111
3,177	5,130	99,577	5,850	0,210	3,177	170,563
3,847	7,700	99,753	6,850	0,363	3,847	214,840
4,180	9,320	99,591			4,180	313,829
4,851	12,600	99,669			4,851	390,072
5,184	15,700	99,730			5,184	336,450
5,851	20,100	99,670			6,188	690,720
6,188	21,100	99,780			6,851	1155,935
6,851	24,300	99,610				

Consumo de substratos e produção de amônio

Tempo (dias)	Glicose (g.L ⁻¹)	Lactato (g.L ⁻¹)	Amônio (mg.L ⁻¹)
0,000	10,700	0,006	185,739
1,156	12,500	0,005	194,493
3,177	12,300	0,006	215,726
4,851	11,350	0,007	265,401
6,188	8,750	0,012	430,431

Consumo de aminoácidos e formação de subprodutos

Tempo (dias)	Serina (g.L ⁻¹)	Glutamina (g.L ⁻¹)	Prolina (g.L ⁻¹)	Cisteína (g.L ⁻¹)	Asparagina (g.L ⁻¹)	Alanina (g.L ⁻¹)
0,000	0,389	3,178	1,863	0,034	1,172	0,394
1,156	0,451	3,365	2,017	0,036	1,272	0,522
3,177	0,612	3,215	1,973	0,034	1,313	0,982
4,851	1,337	2,467	1,511	0,046	1,220	1,596
6,188	1,646	1,336	0,895	0,035	0,876	2,148