

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MONIZE CAIADO DECARLI**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS DE  
*DROSOPHILA MELANOGASTER* S2 EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO  
INDUZIDA POR ONDAS PARA PRODUÇÃO DA GLICOPROTEÍNA  
RECOMBINANTE DO VÍRUS DA RAIVA.**

**SÃO CARLOS-SP**

**2016**

**MONIZE CAIADO DECARLI**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS DE  
*DROSOPHILA MELANOGASTER* S2 EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO  
INDUZIDA POR ONDAS PARA PRODUÇÃO DA GLICOPROTEÍNA  
RECOMBINANTE DO VÍRUS DA RAIVA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia para a obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Professor Dr. Claudio Alberto Torres  
Suazo

**SÃO CARLOS-SP**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D291d Decarli, Monize Caiado  
Desenvolvimento de um processo de cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2 em biorreator com agitação induzida por ondas para produção da glicoproteína recombinante do vírus da raiva / Monize Caiado Decarli. -- São Carlos : UFSCar, 2017.  
146 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Glicoproteína do vírus da raiva. 2. *Drosophila melanogaster* S2. 3. Vacina antirrábica. 4. Proteínas recombinantes. 5. Biorreator Wave. I. Título.

**Monize Caiado Decarli**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia


**Aprovado em: 08/08/2016**

**BANCA EXAMINADORA**




---

Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo (Orientador)  
(Universidade Federal de São Carlos/ UFSCar)



---

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)



---

Profa. Dr.ª Kamilla Swiech Antonietto  
(FCFRP/ USP – Ribeirão Preto)

## *Dedicatória*

*Dedico essa Dissertação de Mestrado à minha amada mãe, meu grande exemplo de força e fé, que vibra comigo à cada conquista, que sonha e embarca comigo em todas as minhas ideias, por mais desafiadoras que pareçam ser. Obrigada por acreditar em mim, por me apoiar em tudo e por destinar a sua vida à maravilhosa construção da nossa! Chegou o momento de colher os frutos...e você estará presente em todos eles!*

*Dedico também ao meu amado irmão, por tudo que você é para mim, ora irmão, ora pai, ora amigo. Enfim, você é único!*

*Devo tudo isso a vocês dois e espero um dia recompensar à altura, iniciando assim, com a dedicação desse trabalho!*

## *Agradecimentos*

À minha família a qual sou eternamente grata por todo apoio, união, amor e companheirismo que existe entre nós! Em especial minha mãe Ana Maria (minha base), meu irmão Fransoel (meu exemplo), minha avó e madrinha Geny, meu tio e padrinho Odisnei, minha priminha Giovana, à Mônica e ao Seu Geraldo (meu avô do coração).

A Deus pela incrível vida que me proporcionou e pela possibilidade do desenvolvimento de todos os meus trabalhos no campo da ciência.

À UFSCar e a comunidade UFSCar, minha segunda casa a qual estou há oito anos. Por me acolher de forma tão bonita e pelos momentos maravilhosos que lá passei! Agradeço também a todos os professores que lá conheci e tive o prazer de conviver.

Ao meu orientador Claudio por confiar em mim para desenvolver um trabalho de tamanha complexidade! Obrigada por conseguir desabrochar o meu “amor escondido pela engenharia química”, por confiar seu laboratório a mim, por todos os ensinamentos, conselhos, indicações e auxílio na escolha dos melhores caminhos.

Ao LATECC, agradeço pela incrível convivência, companheirismo, preocupação e união das nossas forças por uma causa maior. Muitíssimo obrigada aos amigos Diogo, Thaila, Juliana, Viviana, Genoveva, Carol, Rebecca, Eric e Marcelo.

Aos alunos e docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, pelo convívio, pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

Ao Instituto Butantan, em especial ao Laboratório de Imunologia Viral (LIV), pelo carinho e auxílio nessa batalha.

Ao professor Dr. Renato M. Astray, o qual não tenho palavras para agradecer tamanha colaboração! Obrigada por toda ajuda, todo aconselhamento profissional e pessoal e por participar ativamente de todas as discussões acerca do meu trabalho.

À Dra. Daniella Ventini, a qual participou ativamente de todas as minhas dúvidas. Agradeço pela valiosa contribuição e pelas palavras de incentivo constante!

À Dra. Kamilla Swiech pela disponibilidade de colaborar com o nosso laboratório e por contribuir de forma preciosa no desenvolvimento de nossas pesquisas.

À Dra. Daniela Matilde Correia pela colaboração que estamos desenvolvendo nas análises metabolômicas. Agradeço também pelo entusiasmo incentivador e pelos seus ensinamentos.

À secretária do PPG-Biotec, Claudia Pasterga, por todo apoio e compreensão às dificuldades que surgem no caminho.

Aos técnicos Amadeus (DEQ/UFSCar) e Vera (LIV/Instituto Butantan), por todo empenho e dedicação em desenvolver minhas análises.

Aos pesquisadores que constituíram as minhas bancas de Qualificação e Defesa do Mestrado pela disponibilidade e pelas inúmeras contribuições acerca do trabalho: Dr. Renato M. Astray; Dr. Adilson J. Silva; Dra. Kamilla Swiech; Dra. Teresa C. Zangirolami e Dr. Claudio A. T. Suazo.

Ao apoio constante das minhas eternas amigas Carol, Gizella, Fernanda e Nathalia, as irmãs que escolhi! Minhas amigas de outras vidas, de alma e de coração!

Aos amigos que entendem minha ausência muitas vezes e que não deixam de incentivar e apoiar os meus sonhos de carreira! Agradecimento especial ao Mateus e ao Rafael por me cederem o apartamento tantas vezes em São Paulo durante o período das análises no Instituto Butantan e as queridas Desire, Mayara, Taís, Letícia e Camilla.

Enfim, agradeço a todos que participam ativamente da minha vida e também a todos aqueles que me oferecem ao menos uma palavra de carinho!

*“A imaginação é tudo... é a prévia dos tesouros que a vida lhe trará! ”*

*Albert Einstein*

*“Aprenda a ficar sereno e a desviar sua atenção daquilo que não deseja e de toda carga emocional que cerca essas coisas, desloque a atenção para o que você deseja vivenciar...A energia flui para onde a atenção se dirige. ”*

*Michael Beckwith*

*Gratidão por quem eu sou, por tudo que tenho, por todos que fazem parte da minha vida! Gratidão por quem surge sem aviso prévio e permanece em mim sob todas as formas de aprendizado e inspiração! Gratidão por todos aqueles que tenho enorme bem querer e que me querem bem. Gratidão por cada sorriso, cada presença, cada sonho, cada conquista...Gratidão enorme por cada palavra de incentivo e inspiração que ouço frequentemente...e que, felizmente, não são poucas!*



## RESUMO

Embora eficazes, as vacinas atuais contra a raiva, uma das doenças infecciosas mais letais do mundo, apresentam problemas relacionados com a segurança de administração e o custo de produção. Nesse contexto, a biotecnologia moderna se torna uma fonte de alternativas inovadoras de grande interesse para produção de vacinas. O principal antígeno capaz de conferir uma resposta imunológica neutralizante contra o vírus rábico é a glicoproteína do vírus da raiva (RVGP), cuja produção por tecnologia de DNA recombinante vem sendo desenvolvida por pesquisadores do Laboratório de Imunologia Viral (LIV) do Instituto Butantan de São Paulo, utilizando vários sistemas de expressão em células de *Drosophila melanogaster* S2. Um dos mais recentes desenvolvimentos é a linhagem S2MtRVGP-H-His, obtida mediante transfecção estável com plasmídeos contendo entre outros componentes o cDNA da RVGP e a cauda de histidina para facilitar a purificação, ambos sob controle do promotor indutível da metalotioneína. O presente trabalho tem como objetivo o estudo de características cinéticas de crescimento celular e de produção de glicoproteína recombinante do vírus da raiva rRVGP da linhagem de *Drosophila melanogaster* S2MtRVGP-H-His com vistas a avaliação do potencial de um biorreator com agitação induzida por ondas (*waves*) para escalonamento da produção de rRVGP. A primeira etapa dos trabalhos, envolvendo cultivos em batelada em frasco Schott com 20 mL de meio de cultura comercial Sf900-III, permitiu a determinação da temperatura ideal (28°C), o tempo apropriado de indução da expressão (72 h) e das velocidades específicas de crescimento de 0,022-0,034 h<sup>-1</sup>, densidade celular máxima de 1,82×10<sup>7</sup> cel.mL<sup>-1</sup> e rRVGP produzida de 0,07-0,99 µg.mL<sup>-1</sup>. Com base nesses resultados, iniciou-se a segunda parte dos trabalhos com cultivos em biorreator *Wave* utilizando 650 mL de meio Sf900-III, com concentração média de oxigênio dissolvido de 60% da saturação com ar e pH variando sem controle de 6,2-7,0. O cultivo no biorreator apresentou velocidade específica máxima de crescimento de 0,035 h<sup>-1</sup>, densidade celular máxima de 1,1×10<sup>7</sup> cel.mL<sup>-1</sup> e rRVGP produzida de 0,85 µg.mL<sup>-1</sup>. A produção da rRVGP em larga escala com células S2MtRVGP-H-His utilizando o biorreator *Wave* mostrou ser uma alternativa viável, reprodutível e com grande potencial de escalonamento.

**Palavras-chave:** Glicoproteína do vírus da raiva; *Drosophila melanogaster* S2; vacina antirrábica; proteínas recombinantes, biorreator *Wave*.

## ABSTRACT

Although effective, current vaccinations against rabies, one of the most lethal infectious diseases in the world, present security issues of administration and production costs. In this scenario, modern biotechnology has become a source of new alternatives of great interest for vaccine production. The main antigen capable of conferring neutralizing immune response against infection by rabies virus is the glycoprotein of rabies virus (RVGP), which the production by recombinant DNA technology has been developed by researchers at the Viral Immunology Laboratory (LIV) of the Butantan Institute of São Paulo using various expression systems in *Drosophila melanogaster* S2 cells. One of the latest developments is S2MtRVGP-H-His cell line, obtained by stable transfection with plasmids containing cDNA from other components of RVGP and histidine tag to facilitate purification, both under control of the inducible metallothionein promoter. This work aims to study the kinetic characteristics of cell growth and production of recombinant glycoprotein rRVGP rabies virus strain of *Drosophila melanogaster* S2MtRVGP-H-His, in order to evaluate the potential of a bioreactor with agitation induced by waves (Wave) for the scale-up production of rRVGP. The first stage of the study, involving batch cultures in 20 mL Schott bottle with commercial culture medium Sf900-III, allowed us to determine the optimal temperature of cultivation (28°C), time of induction of expression (72 h), the specific growth rate ranging from 0.022 to 0,034 h<sup>-1</sup>; maximum cell density 1.82×10<sup>7</sup> cel.mL<sup>-1</sup> and rRVGP produced from 0.07 to 0.99 µg.mL<sup>-1</sup>. Based on these results, was started the second part of the study performed in the Single-use Wave bioreactor, involving batch cultures with 650 mL of Sf900-III, with 60% of dissolved oxygen and pH ranging without control from 6.2 to 7.0. The culture in the bioreactor showed maximum specific growth rate of 0,035 h<sup>-1</sup>, maximum cell density was 1.1×10<sup>7</sup> cel.mL<sup>-1</sup> and RVGP produced 0.85 µg.mL<sup>-1</sup>. The production of large scale rRVGP with S2MtRVGP-H-His cells using the Wave bioreactor has shown to be viable, reproducible and with high potential to scale-up.

**Keywords:** glycoprotein of rabies virus; *Drosophila melanogaster* S2; rabies vaccination; recombinant proteins; Wave Bioreactor

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos níveis de risco para seres humanos entrarem em contato com a raiva. ....	23
Figura 2: Resposta imune das vacinas virais. ....	29
Figura 3: Aprovação dos biofármacos pela FDA de 1982 a 2012. ....	31
Figura 4: Estrutura do vírus rábico evidenciando suas cinco proteínas principais.....	35
Figura 5: Esquema demonstrando os domínios da glicoproteína do vírus da raiva. ....	36
Figura 6: Foto do inseto <i>Drosophila melanogaster</i> (A) e das células <i>Drosophila melanogaster</i> S2 em cultivo (B) na forma isolada e na forma de aglomerados celulares, visualizadas pelo microscópio óptico em hematocitômetro. ....	38
Figura 7: Esquema do padrão de glicosilação em diferentes tipos celulares.....	45
Figura 8: Análise por microscopia confocal realizada com as células selvagens (A) e recombinantes (B). As células recombinantes foram induzidas com CuSO <sub>4</sub> em 72 h e com 120 h de cultivo foram coletadas e examinadas para a microscopia confocal, imagem B. ....	49
Figura 9: Visão geral das vias de Glicólise e Ciclo das pentoses fosfato.....	53
Figura 10: Visão geral da principal via metabólica da glutamina. ....	54
Figura 11: Via metabólica dos insetos envolvendo os aminoácidos prolina e alanina. .	58
Figura 12: Cinética do crescimento celular, o consumo de nutrientes e formação de produto no modo batelada. ....	66
Figura 13: Esquema de funcionamento do Biorreator <i>Wave</i> – Sistema 2/10. ....	67
Figura 14: Biorreator <i>Wave</i> <sup>TM</sup> – Sistema 2/10. Plataforma de operação e <i>Cellbag</i> <sup>TM</sup> (A); módulo de controle <i>Wavepod</i> <sup>TM</sup> II Integrated Controller (B).....	67
Figura 15: Mapa do vetor de expressão da célula S2MtRVGP-H-His.....	70
Figura 16: Esquema ilustrativo do procedimento padronizado para cultivo das células em pequena escala. ....	77
Figura 17: Esquema ilustrativo do procedimento padronizado para cultivo das células em larga escala. ....	78
Figura 18: Biorreator <i>Wave</i> <sup>TM</sup> – modelo 2/10 em funcionamento. ....	79
Figura 19: <i>Cellbag</i> <sup>TM</sup> do cultivo de células S2MtRVGP-H-His com os sensores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura acoplados ao sistema. ....	80

Figura 20: Análise da curva de crescimento com o consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de S2MtRBGP-H-His por 192 h, com indução por CuSO <sub>4</sub> . Operado em frasco Schott (V <sub>frasco</sub> =100 mL;V <sub>trabalho</sub> =20 mL), à 28°C, agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo indicado pela seta.....	85
Figura 21: Evolução do consumo/produção de aminoácidos críticos durante o cultivo com indução com cobre de células S2MtRBGP-H-His por 192 h em frasco Schott à 28°C e agitação 100 rpm. ....	86
Figura 22: Comparação da cinética de crescimento entre as linhagens selvagem e recombinante em cultivos realizados em triplicata. Os cultivos 1, 2 e 3 da linhagem S2MtRVGP-H-His e o cultivo induzido da linhagem selvagem receberam a indução de CuSO <sub>4</sub> em 72 h. Nos demais cultivos não houve adição de CuSO <sub>4</sub> .....	87
Figura 23: Análise comparativa do consumo de glicose durante o cultivo de células S2 selvagem e S2MtRVGP-H-His por 192 h de cultivo em frasco Schott à 28°C e agitação de 100 rpm. ....	90
Figura 24: Análise comparativa do consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de células S2MtRBGP-H-His por 192 h de cultivo em frasco Schott à 28°C e agitação de 100 rpm.....	91
Figura 25: Análise comparativa do consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de células S2 Selvagem por 192 h de cultivo em frasco Schott à 28°C e agitação de 100 rpm.....	91
Figura 26: Resultados do Experimento 1 do cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por CUSO <sub>4</sub> , em frasco Schott (V <sub>frasco</sub> =100 mL;V <sub>trabalho</sub> =20 mL), à 28°C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo indicado pela seta no gráfico.....	93
Figura 27: Resultados do Experimento 2 do cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por CUSO <sub>4</sub> , em frasco Schott (V <sub>frasco</sub> =100 mL; V <sub>trabalho</sub> = 20 mL, à 25°C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h do cultivo, indicado pela seta no gráfico. ..	96
Figura 28: Resultados do Experimento 3 do cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por CuSO <sub>4</sub> , em frasco Schott (V <sub>frasco</sub> = 100 mL; V <sub>trabalho</sub> = 20 mL), à 22°C, com agitação de 100 rpm e indução à 96 h do cultivo, indicado pela seta no gráfico. ..	98
Figura 29: Resultados obtidos nos experimentos em frasco Schott de células S2MtRVGP-H-His em diferentes temperaturas de cultivo: 28, 25 e 22°C, operado em frasco Schott (V <sub>frasco</sub> = 100 mL; V <sub>trabalho</sub> = 20 mL) com agitação de 100 rpm .....	100
Figura 30: Resultados de produção de rRVGP em frasco Schott durante o cultivo de células S2MtRBGP-H-His nos Experimentos 1, 2 e 3, em função da densidade celular, operado em frasco Schott (V <sub>frasco</sub> = 100 mL; V <sub>trabalho</sub> = 20 mL) com agitação de 100 rpm. ....	101
Figura 31: Análise comparativa dos quatro tempos de indução (0h, 24h, 48h e 72h) da expressão de rRVGP por CuSO <sub>4</sub> no cultivo da célula S2MtRVGP-H-His em frasco Schott(V <sub>frasco</sub> = 100 mL; V <sub>trabalho</sub> =20 mL), à 28°C, com agitação de 100 rpm. ....	103

Figura 32: Análise comparativa da produção de rRVGP no cultivo da célula S2MtRVGP-H-His em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$ mL; $V_{\text{trabalho}}=20$ mL), T:28°C, agitação de 100 rpm em quatro tempos de indução da expressão por CuSO <sub>4</sub> (0h, 24h, 48h e 72h), em função da densidade celular.....	104
Figura 33: Resumo comparativo da produção de rRVGP em função da densidade celular nos cultivos de células S2MtRVGP-H-His em frasco Schott para definição da temperatura e tempo de adição de CuSO <sub>4</sub> apropriados para produção eficiente de rRVGP. ....	106
Figura 34: Formação de aglomerados celulares após a adição do antibiótico Higromicina B para seleção de células recombinantes em microscópio óptico convencional com aumento de 40x na lente objetiva e 10x na lente ocular.....	107
Figura 35: Resultados do primeiro experimento de cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator <i>Wave</i> , com volume de 650 mL em <i>Cellbag</i> de 1 L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de $5 \times 10^5$ cel.mL <sup>-1</sup> , temperatura de 28°C, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 40%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO <sub>4</sub> foi de 72 h. ....	110
Figura 36: Resultados do segundo experimento de cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator <i>Wave</i> com volume de 650 mL em <i>Cellbag</i> de 1 L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de $5 \times 10^5$ cel.mL <sup>-1</sup> , temperatura de 28°C, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 40%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO <sub>4</sub> foi de 72 h. ....	111
Figura 37: Resultado dos dois experimentos de cultivo em biorreator <i>Wave</i> para produção de rRVGP. ....	117
Figura 38: Análise comparativa de crescimento celular e produção de rRVGP nos experimentos de cultivo de células S2MtRVGP-H-His em pequena (frasco Schott, $V_{\text{final}}=20$ mL) e larga escala (Biorreator <i>Wave</i> , $V_{\text{final}}=650$ mL). ....	119
Figura 39: Comparação do crescimento celular nas primeiras 72 horas de cultivo em frascos Schott e biorreator <i>Wave</i> . ....	120

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vacinas de primeira e segunda geração desenvolvidas para a imunização contra o vírus da raiva para uso humano. ....	26
Tabela 2: Características das vacinas com vírus vivo atenuado, vírus inativado e vacinas recombinantes. ....	28
Tabela 3: Biofármacos aprovados em 2013 nos Estados Unidos (EUA) e na União Europeia (EU). ....	32
Tabela 4: Comparação dos sistemas de expressão de proteínas recombinantes. ....	40
Tabela 5: Produtos farmacêuticos obtidos e licenciados com linhagens de insetos para uso humano ou veterinário. ....	41
Tabela 6: Sistemas de expressão já utilizados para a expressão da glicoproteína do vírus rábico. ....	42
Tabela 7: Comparativo de condições de cultivo entre insetos e mamíferos. ....	46
Tabela 8: Principais nutrientes e metabólitos do metabolismo das células S2. ....	62
Tabela 9: Processos industriais realizados em larga escala para produção de vacinas, anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes. ....	64
Tabela 10: Resumo de todos os experimentos realizados neste trabalho. ....	82
Tabela 11: Resultado da análise do meio de cultura Sf-900 II feita por Swiech <i>et al.</i> (2007) e Sf-900 III neste trabalho. ....	84
Tabela 12: Velocidades específicas de crescimento no cultivo das linhagens S2MtRVGP-H-His e S2- Selvagem realizado em triplicata. ....	88
Tabela 13: Análise comparativa ponto a ponto dos cultivos de S2MtRVGP-H-His e S2-Selvagem. ....	89
Tabela 14: Densidade celular final dos quatro tempos de adição de $CUSO_4$ (0h, 24, 48h e 72h) no cultivo da célula S2MtRVGP-H-His em meio Sf-900 III, realizados em frasco Schott. ....	104
Tabela 15: Condições experimentais utilizadas no biorreator <i>Wave</i> nos Experimentos 7 e 8. ....	108
Tabela 16: Dados comparativos de produção da rRVGP com células S2MtRVGP-H-His em biorreator <i>Wave</i> e <i>Bioflo</i> 110. ....	115
Tabela 17: Análise do crescimento celular ao longo do tempo nos Experimentos 7 e 8. ....	118
Tabela 18: Análise do crescimento celular ao longo do tempo nos experimentos de pequena e larga escala. ....	120

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu$	Velocidade específica de crescimento celular
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration (US)</i>
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
GH	Hormnio de crescimento humano ( <i>Growth Human</i> )
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
O <sub>2</sub>	Oxigênio
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rRVGP	Glicoproteína do vrus da raiva recombinante – cepa Pasteur
rS2	Células recombinantes de <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2
RVGP	Rabies Virus Glycoprotein – Pasteur strain
S2	Células de <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2
S2MtRVGP-H-His	Células recombinantes do presente estudo para expressar RVGP com cauda de histidina sob domínio do promotor da metalotioneína selecionadas com higromicina
UE	Uno Européia
USA	<i>Unites States of America</i>
Wave	Biorreator <i>Wave</i> <sup>TM</sup> – Sistema 2/10, GE HEALTHCARE®
X	Densidade celular
X <sub>máx</sub>	Densidade celular máxima

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
	<b>3.1 A raiva e o cenário mundial .....</b>	<b>22</b>
	<b>3.2 A vacinação antirrábica .....</b>	<b>23</b>
	3.2.1 Vacinas .....	23
	3.2.2 O histórico da vacina antirrábica.....	24
	3.2.3 A nova geração de vacinas: produção de proteínas recombinantes .....	26
	3.2.4 Comparativo entre os tipos de vacinais.....	27
	<b>3.3 O panorama atual da produção industrial dos biofármacos .....</b>	<b>30</b>
	<b>3.4 O vírus rábico, a glicoproteína G e a importância da glicosilação.....</b>	<b>34</b>
	<b>3.5 Células do inseto <i>Drosophila melanogaster</i> S2.....</b>	<b>37</b>
	3.5.1 Sistemas de expressão e a cultura de células de insetos.....	39
	3.5.2 Expressão da glicoproteína rRVGP em células S2 .....	47
	3.5.3 O metabolismo das células de <i>Drosophila melanogaster</i> em cultura .....	50
	3.5.3.1 Metabolismo da prolina .....	51
	3.5.3.2 Metabolismo da glicose e lactato.....	51
	3.5.3.3 Metabolismo da glutamina e amônia.....	53
	3.5.3.4 Efeitos do acúmulo de subprodutos do cultivo e atuação de outros aminoácidos .....	55
	3.5.3.5 A estabilidade da glicoproteína .....	58
	3.5.3.6 Metabolismo de oxigênio .....	59
	3.5.3.7 Visão global do metabolismo para fins de monitoramento de experimentos.....	61
	3.5.3.8 Meios de cultura para células de inseto .....	62
	<b>3.6 Cultivo de células de <i>Drosophila melanogaster</i> no Wave Bioreactor (Single-use System) .....</b>	<b>64</b>
	<b>3.7 Comentários Gerais .....</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
	<b>4.1 Linhagem celular S2MtRVGP-H-HIS .....</b>	<b>70</b>
	<b>4.2 O meio de cultura Sf-900® III .....</b>	<b>71</b>
	<b>4.3 Procedimentos seguidos nos experimentos de cultivo de células.....</b>	<b>71</b>



4.3.1 Banco de células.....	71
4.3.2 Descongelamento de células .....	72
4.3.3 Seleção da linhagem recombinante com antibiótico higromicina.....	72
4.3.4 Cultivo em frasco Schott .....	73
4.3.5 Amostragem .....	73
<b>4.4 Métodos analíticos.....</b>	<b>74</b>
4.4.1 Densidade celular e viabilidade.....	74
4.4.2 Quantificação de glicose e lactato .....	74
4.4.3 Quantificação de amônia.....	74
4.4.4 Quantificação de aminoácidos em cultivo .....	75
<b>4.5 Quantificação da rRVGP produzida.....</b>	<b>76</b>
<b>4.6 Experimentos em frasco Schott para estudo da cinética de crescimento e expressão de rRVGP da célula S2MtRVGP-H-His em cultura.....</b>	<b>77</b>
<b>4.7 Experimento em biorreator <i>Wave</i> para produção de rRVGP em larga escala .....</b>	<b>78</b>
<b>4.8 Metodologias de cálculos .....</b>	<b>80</b>
<b>4.9 Descrição dos experimentos realizados nesta pesquisa .....</b>	<b>82</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>5.1 Estudo em pequena escala das principais características cinéticas e fisiológicas das células S2MtRVGP-H-His .....</b>	<b>83</b>
5.1.1 Análise da composição do meio de cultura para verificar necessidade de suplementação. ....	83
5.1.2 Comparação do metabolismo e da cinética de crescimento entre as células recombinantes S2MtRVGP-H-His e as células S2 selvagens.....	87
5.1.3 Estudo da temperatura ótima de cultivo para as células S2MTRVGP-H-His e expressão da RVGP.....	92
5.1.4 Definição do tempo ideal da adição de CuSO <sub>4</sub> para indução da expressão da rRVGP.....	101
<b>5.2 Estudo em larga escala para maximização da expressão da glicoproteína rRVGP em biorreator com agitação induzida por ondas (<i>Waves</i>).....</b>	<b>108</b>
<b>5.3 Análise da reprodutibilidade de cultivos em larga escala e da viabilidade do escalonamento. ....</b>	<b>116</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>122</b>
<b>7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>123</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>124</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>130</b>

Apêndice A: Crescimento celular.....	131
Apêndice B: Quantificação de rRVGP .....	134
Apêndice C: Consumo de substratos e formação de produtos .....	142

## 1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma encefalite viral grave transmitida por mamíferos, únicos animais susceptíveis ao vírus, apresentando uma mortalidade em seres humanos de 100% em casos não tratados (YANG *et al.*, 2013). É conhecida como uma das doenças infecciosas mais letais, sendo responsável por aproximadamente 55 mil mortes por ano no mundo inteiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O tratamento profilático é uma das estratégias mais eficazes para o controle da transmissão do vírus da raiva e atualmente poupa cerca de 330 mil mortes anuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A estratégia preventiva consiste em controlar a zoonose diretamente no hospedeiro do vírus por meio da vacinação. Ao longo dos últimos 100 anos, várias vacinas foram utilizadas para evitar e controlar a proliferação do vírus da raiva, tais como a vacina com vírus vivo atenuado e a vacina com vírus inativado que, apesar de se mostraram eficazes em todo o mundo, apresentavam inúmeras reações adversas (DERTZBAUGH *et al.*, 1998) e não mostravam a segurança de administração necessária para atuar como método de imunização em massa (MASATANI *et al.*, 2010).

Com o domínio de novas técnicas e ferramentas propiciadas pelos avanços inovadores em cultivo de células e biologia molecular tornou-se possível a obtenção de uma nova classe de vacinas, tais como as vacinas recombinantes, as vacinas vetoriais e as vacinas baseadas em DNA (YANG *et al.*, 2013). Essas novas abordagens se baseiam na construção de vetores moleculares eficientes e no desenvolvimento de linhagens recombinantes para atuarem como sistemas de expressão de proteínas (LEMOS *et al.*, 2009; ASTRAY *et al.*, 2014), que conseguem oferecer o suporte necessário para solucionar os problemas relatados, além de permitir a exploração de outras limitações das vacinas convencionais, tais como a diminuição do custo do processo (MASATANI *et al.*, 2010) e a possibilidade de produção em larga escala (SWIECH *et al.*, 2008).

O principal antígeno capaz de conferir resposta imunológica neutralizante contra a infecção com o vírus rábico é a glicoproteína RVGP (*Rabies Virus Glycoprotein*), que corresponde a uma proteína transmembrânica trimérica (GAUDIN *et al.*, 1992) dependente de glicosilação para preservação de sua imunogenicidade (WOJCZYK *et al.*, 1998). Dessa forma, como essa proteína é o principal antígeno torna-se o elemento principal a ser considerado no desenvolvimento de uma vacina recombinante (ASTRAY

*et al.*, 2014) e o sucesso da sua obtenção em grandes quantidades é fator preponderante para o desenvolvimento do processo em larga escala (SWIECH *et al.*, 2008).

O Laboratório de Imunologia Viral (LIV) do Instituto Butantan desenvolve há 10 anos pesquisa voltada à modificação genética de células de *Drosophila melanogaster* S2 para expressar a forma recombinante da RVGP (rRVGP) de forma cada vez mais eficiente (VENTINI *et al.*, 2014). Essa linha de pesquisa tem como meta principal a obtenção do antígeno em larga escala para fins de diagnóstico e vacinal. Além disso, diversas características próprias das células S2 relacionadas à fácil manipulação, adaptação às quantidades baixas de oxigênio e resistência ao cisalhamento (MORAES *et al.*, 2008), bem como sua reconhecida versatilidade metabólica (SWIECH *et al.*, 2007), tornam essas células atrativas para o desenvolvimento de processos de cultivo em biorreator visando a produção de rRVGP em larga escala.

Para poder atingir esse objetivo o desenvolvimento de linhagens de células S2 recombinantes com alta capacidade de expressão de rRVGP é de primordial importância. Avanços nesse sentido já foram conseguidos através da construção de vetores moleculares; adequação de melhores promotores (LE MOS *et al.*, 2009; ASTRAY *et al.*, 2014); caracterização fisiológica e cinética (SWIECH *et al.*, 2007) e adição de componentes ao vetor de expressão para possibilitar uma eficiente purificação da proteína produzida (VENTINI *et al.*, 2014). Na revisão bibliográfica será apresentada de forma mais detalhada a cronologia de desenvolvimento das linhagens S2AcRVGP com promotor constitutivo, S2MtTiRVGP com promotor para expressão transiente e S2MtRVGP-H com promotor indutível, mostrando para cada caso os valores de rRVGP obtidos.

Em 2010 o LIV produziu uma nova linhagem com um elenco de características sob medida para processos de cultivo em biorreator, a S2MtRVGP-H-His. A principal novidade nesta linhagem é a inserção de um gene que codifica para a expressão do aminoácido histidina (His) que quando presente na cadeia proteica da rRVGP confere um aumento substancial na eficiência de separação e purificação ao utilizar técnicas de cromatografia de afinidade. Em experimentos preliminares essa linhagem apresentou crescimento celular em biorreator semelhante às linhagens sem cauda de histidina (VENTINI *et al.*, 2014), despertando maior interesse para seu uso em bioprocessos de produção de rRVGP. A partir desses descobrimentos surgiu a necessidade de conhecer melhor a cinética de crescimento e de produção de rRVGP da linhagem S2MtRVGP-H-

His para poder dar continuidade aos estudos de purificação e de capacidade imunogênica da glicoproteína produzida.

Ao longo desses aprimoramentos realizados foram obtidas concentrações finais de rRVGP crescentes no cultivo das células rS2 (LEMOS *et al.*, 2009; SWIECH *et al.*, 2007; PATIÑO *et al.*, 2014; VENTINI *et al.*, 2014) e a experiência adquirida pelo grupo do Instituto Butantan e de seus parceiros, dentre os quais o Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC) do DEQ/UFSCar no qual o presente trabalho está sendo desenvolvido, permitiu evidenciar a importância do desenvolvimento de um cultivo em larga escala em biorreator, pois somente com uma produção em um sistema bem monitorado e controlado será possível obter rRVGP em quantidade e qualidade necessárias. O presente trabalho está inserido em um contexto de pesquisa inédita e original, já que o grupo interdisciplinar formado pela parceria entre ambos os laboratórios (LIV e LATECC) é um dos poucos no cenário nacional e internacional atual com experiência no desenvolvimento tecnológico de produção da rRVGP.

Embora já exista um trabalho mostrando o cultivo da linhagem S2MtRVGP-His em biorreator tradicional de tanque agitado (VENTINI *et al.*, 2014) existem outros biorreatores alternativos com características inovadoras que os tornam fortes candidatos para serem utilizados no escalonamento de processos de cultivo com células de inseto. O biorreator com agitação induzida por ondas, ou biorreator *Wave*, é um dos mais cotados para substituir o tanque agitado pelas vantagens que oferece, especialmente no que se refere ao baixo cisalhamento e aos baixos custos de investimento e de operação. Além disso, utiliza uma tecnologia que conta com a aprovação dos órgãos reguladores no mundo inteiro. Levando em consideração tantos fatores favoráveis, a escolha deste equipamento para analisar a viabilidade de produção de rRVGP em larga escala se reveste de grande interesse e relevância. Na revisão bibliográfica serão discutidas com maior profundidade as vantagens e desvantagens do uso desse biorreator (FRIES *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012).

Convém esclarecer que, embora a célula S2 venha despertando grande interesse para produção de várias proteínas recombinantes, como a interleucina humana, as subunidades hormonais FSH e LH, algumas proteínas do vírus HIV e mais recentemente a proteína do envelope do vírus da dengue (CHÁ *et al.*, 2005; CLEMENTS *et al.*, 2010), a literatura específica relacionada com a utilização da célula S2 para produção da rRVGP é bastante restrita. Por essa razão as citações se limitarão aos trabalhos publicados quase que exclusivamente pelos grupos mencionados nos parágrafos anteriores.

O conhecimento a ser gerado neste trabalho será fator fundamental para o estabelecimento de um bioprocesso com essa nova linhagem de células S2 para a produção da rRVGP com alta qualidade. Um dos maiores desafios a enfrentar no desenvolvimento desse bioprocesso se encontra na observação destacada por Barnes *et al.* (2001) e Hayter *et al.* (1992) referente a relação inversa que existe entre crescimento celular e produtividade de linhagens celulares clonadas, particularmente as linhagens transfectadas, de modo que, quanto melhor for o crescimento celular, menor será a produção de proteína recombinante. Assim, o maior desafio do presente trabalho se encontra na busca pelo equilíbrio entre o crescimento celular e a produção de proteína, que deve ser levado em consideração para poder alcançar uma alta produtividade no bioprocessos.

Para atingir essa meta, propõe-se um estudo sequencial envolvendo primeiro a identificação de características cinéticas da linhagem S2MtRVGP-H-His e, segundo, uma avaliação do cultivo em biorreator *Wave*. Sendo assim, o presente estudo contribuirá na base dos conhecimentos para o que poderá ser um bioprocessos econômico e eficiente de produção da rRVGP em larga escala para estudos clínicos com a utilização do biorreator *Wave*.

## 2 OBJETIVOS

### **Objetivo geral:**

Estudo de características cinéticas de crescimento celular e produção de glicoproteína do vírus da raiva rRVGP da linhagem recombinante de *Drosophila melanogaster* S2MtRVGP-H-His com vistas a definição de um processo de cultivo em biorreator com agitação induzida por ondas (*Waves*).

### **Os objetivos específicos deste trabalho são:**

- 1- Determinação das principais características cinéticas de crescimento celular e de expressão de rRVGP da linhagem S2MtRVGP-H-His em estudos em pequena escala (20 mL);
- 2- Desenvolvimento de um protocolo de cultivo em larga escala (~650 mL) utilizando o biorreator com agitação induzida por ondas (*wave*) para a produção de rRVGP como avaliação preliminar da viabilidade de escalonamento;
- 3- Produção de um lote de rRVGP da ordem de 1 mg para ser utilizado em estudos de purificação e caracterização imunológica no Instituto Butantan.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A raiva e o cenário mundial

A raiva é uma zoonose viral causada pelo vírus *Rhabdovirus*, que afeta os mamíferos e é caracterizada como uma encefalite progressiva aguda e letal. Todos os mamíferos são suscetíveis aos vírus rábico e podem transmiti-lo, fazendo com que a doença apresente um ciclo urbano, rural e silvestre (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A infecção ocorre através do contato com material infeccioso, normalmente saliva oriunda da mordida, ou ainda, através de arranhão do animal infectado. Na Ásia e África, os cachorros ainda são os principais hospedeiros e transmissores da doença, onde o risco de contato dos humanos com o vírus é considerado o mais alto do mundo. Nas Américas, o principal hospedeiro é o morcego (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2014).

A raiva é caracterizada pelo fato do vírus rábico possuir tropismo por neurônios e, portanto, se propagar pelo sistema nervoso periférico e posteriormente atingir o sistema nervoso central, desenvolvendo uma inflamação progressiva que pode culminar em uma encefalite fatal (MASATANI *et al.*, 2010). Os sintomas iniciais incluem febre, formigamento e dor no local da infecção, seguida por duas formas de manifestação: raiva furiosa; caracterizada pelo comportamento de excitação, hiperatividade e hidrofobia com morte por parada cardiorrespiratória; e a raiva paralítica; em que os músculos paralisam gradualmente até culminar em coma e morte (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2014).

A raiva é classificada como uma das doenças mais antigas já descritas, em que anualmente são registrados de 40 a 70 mil mortes espalhadas pelo mundo todo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Em casos não tratados o número de óbitos alcança 100%, o que caracteriza a doença como um grande problema de saúde pública (YANG *et al.*, 2013).

Desde as primeiras tentativas de controle e tratamento da doença até hoje, a estratégia que têm se mostrado mais eficaz para a prevenção da raiva consiste no controle do hospedeiro do vírus por meio da vacinação. Diversos estudos comprovaram que a vacina antirrábica é a arma mais eficaz para combater essa zoonose fatal nos mamíferos, incluindo humanos. Ao longo dos últimos 100 anos, várias vacinas foram desenvolvidas com eficácia comprovada em todo o mundo (YANG *et al.*, 2013).

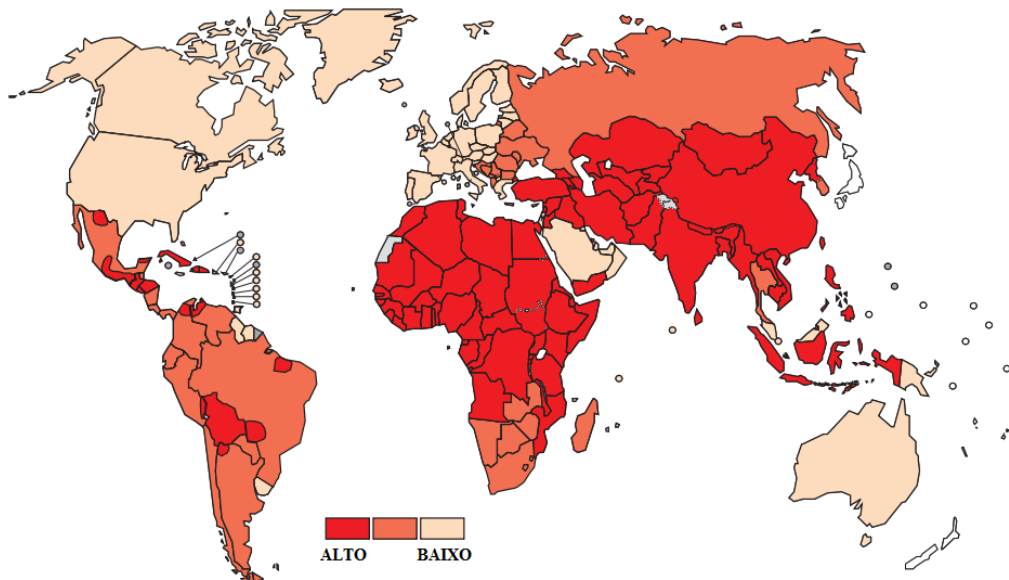
A vacina contra a raiva pode ser administrada pré ou pós-exposição ao vírus rábico. A vacinação prévia é indicada para pessoas ou profissionais da saúde que viajam



para regiões endêmicas e a pós-vacinação é indicada após o indivíduo ter entrado em contato com o vírus, que normalmente ocorre pela mordida de fácil visualização, sendo que o período de incubação viral é de tempo suficiente para a vacina induzir a resposta imune de proteção no indivíduo (HICKS *et al.*, 2012).

Cerca de 15 milhões de pessoas espalhadas pelo mundo recebem anualmente a vacinação pós-exposição ao vírus rábico e apesar de estar presente em todos os continentes, exceto Antártica, como demonstrado na Figura 1, a raiva é caracterizada por ser uma doença negligenciada, visto que é endêmica em populações de baixa renda, na qual 95% das mortes humanas ocorrem na Ásia e África (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Figura 1: Distribuição dos níveis de risco para seres humanos entrarem em contato com a raiva.



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014.

## 3.2 A vacinação antirrábica

### 3.2.1 Vacinas

As vacinas foram classificadas como a intervenção médica mais eficaz do século passado na redução da mortalidade e morbidade causada por doenças infecciosas. Dentre os principais avanços podemos citar a erradicação da varíola e a redução drástica da poliomielite no mundo todo. Com a implantação dos programas nacionais de imunização nos países desenvolvidos, a maioria das infecções virais e bacterianas que acometiam

crianças foi potencialmente reduzida. Estima-se que atualmente a vacinação salva por ano cerca de 2 a 3 milhões de pessoas no mundo todo (DELANY *et al.*, 2014).

A vacinação compreende períodos determinados pelos avanços tecnológicos alcançados. A primeira era de ouro da vacinação corresponde ao período em que Pasteur, Koch, Ramon e Mérieux desenvolveram as vacinas baseadas em patógenos atenuados ou inativos, (DELANY *et al.*, 2014) denominadas “Vacinas de primeira geração” (PÉREZ *et al.*, 1997). A segunda era de ouro corresponde à inovação da produção de vacinas através da tecnologia de cultivo celular, na metade do século XX (DELANY *et al.*, 2014), em que teve início o desenvolvimento das vacinas denominadas “Vacinas de segunda geração” (PÉREZ *et al.*, 1997).

Em 1980, iniciou-se uma nova era, a qual alguns autores denominaram como “Vacinas de terceira geração” (YANG *et al.*, 2013), que correspondem aos recentes desenvolvimentos envolvendo vacinas obtidas principalmente através de proteínas recombinantes, bem como através de outras metodologias como as vacinas VLP ou ainda, as vacinas de DNA e RNA (YANG *et al.*, 2013; ASTRAY *et al.*, 2014).

### 3.2.2 O histórico da vacina antirrábica

A primeira vacina antirrábica produzida com sucesso para ser ministrada em humanos foi desenvolvida em 1885 por Louis Pasteur (PÉREZ *et al.*, 1997). O método se baseava na inoculação de homogeneizados dessecados da medula de coelhos infectados com o vírus rábico. Inicialmente a suspensão inoculada continha carga viral completamente inativada, seguindo de doses preparadas com concentração progressiva de virulência (HICKS *et al.*, 2012). Com a comprovação da eficácia da abordagem de Pasteur, a metodologia se disseminou amplamente pelo mundo e foi utilizada para o desenvolvimento de vacinas de diversos outros tipos (PÉREZ *et al.*, 1997). Com o tempo a técnica passou a ser realizada e classificada em duas abordagens diferentes, uma abordagem contava com a utilização do vírus vivo atenuado e a outra com vírus inativo (DERTZBAUGH, 1998).

Contudo, a inoculação da suspensão virulenta apresentava um risco potencial de desenvolvimento da doença, visto que havia presença residual de vírus vivos (HICKS *et al.*, 2012) e, como agravante, devido ao fato do alto neurotropismo do vírus rábico, o residual poderia se propagar rapidamente pelo sistema nervoso e iniciar o desenvolvimento da inflamação progressiva (MASATANI *et al.*, 2010). Além disso, reações pós-vacinação eram relatadas e a baixa concentração de antígenos por dose

culminava em um grande número de inoculações para alcançar a imunização adequada. Por esse motivo as vacinas com a inoculação de suspensão virulenta são consideradas por muitos autores como vacinas “não seguras” (PÉREZ *et al.*, 1997; HICKS *et al.*, 2012; MASATANI *et al.*, 2010).

A utilização dos substratos animais foi realizada por mais de cem anos consecutivos. Para a vacina da raiva, os principais substratos utilizados foram: tecido nervoso de ovelhas, cabras e coelhos; tecido cerebral de camundongo, rato e coelho; embriões de frango e pato. No entanto, em 2005, devido às reações adversas relatadas em humanos e animais, a Organização Mundial da Saúde recomendou que as vacinas produzidas a partir de tecidos nervosos fossem substituídas pelas vacinas obtidas a partir do cultivo de células, vacinas de segunda geração (YANG *et al.*, 2013).

A primeira cultura de células que obteve resultados significantes na produção de vacinas antirrábicas foi obtida em 1958 a partir de cultivo de células de rim de camundongo, BHK 21 (HICKS *et al.*, 2012) que foram utilizadas para uso veterinário por um longo período (KRETZMER, 2002). Além da BHK, cepas da vacina antirrábica foram desenvolvidas em linhagens de fígado de camundongo, cérebro de porco, neuroblastoma murino e embrião de frango (YANG *et al.*, 2013).

Na busca por maior segurança na produção das vacinas com enfoque para uso humano, houve a substituição por linhagens humanas, como a linhagem WI-38, derivada de pulmão de feto humano e posteriormente a linhagem MRC-5, também derivada do pulmão humano (KRETZMER *et al.*, 2002; PÉREZ *et al.*, 1997).

Atualmente o Instituto Butantan, principal produtor de imunobiológicos do Brasil, é o responsável pela distribuição da vacina da raiva (produzida pelo sistema de células *Vero*, linhagem obtida a partir de células renais de macaco). Todos os produtos do Instituto são destinados ao Ministério da Saúde, que os distribui à população pelo Sistema Único de Saúde, SUS (Portal do Instituto Butantan).

O estudo da utilização de substratos animais e o desenvolvimento de diversas linhagens celulares permitiram o desenvolvimento e licenciamento de algumas vacinas para a imunização da raiva, descritos na Tabela 1 a seguir:

**Tabela 1: Vacinas de primeira e segunda geração desenvolvidas para a imunização contra o vírus da raiva para uso humano.**

Vacina	Substrato/ linhagem	Vírus	Inativação	Característica
Vacina Fuenzalida & Palácios modificada	Cérebro de camundongos recém-nascidos	Cepa Pasteur	Betapropiolactona	Alto poder antigênico
Vacina HDCV ( <i>Human Diploid Cell Vaccine</i> )	Célula diplóide humana	Cepa Pitman-Moore	Betapropiolactona	Redução dos eventos adversos
Vacina PVCV purificada ( <i>Purified Vero Cell Vaccine</i> )	Células Vero	Cepa Pitman-Moore	Betapropiolactona	Eficácia e segurança semelhantes à HDCV
Vacina PCEV ( <i>Purified Chick-Embryo Cell Vaccine</i> )	Fibroblastos de embrião de galinha	Cepa Fleury LEP-C25	Betapropiolactona	Eficácia e segurança semelhantes à HDCV
Vacina PDEV ( <i>Purified Duck-embryo Vaccine</i> )	Vírus cultivado em ovos embrionados	Cepa Pitman-Moore	Betapropiolactona	Mais eventos adversos, comparadas com a HDCV

Fonte: PORTAL DAS VACINAS

### 3.2.3 A nova geração de vacinas: produção de proteínas recombinantes

Em 1980, com o avanço da biotecnologia foi desenvolvida a “Tecnologia do DNA recombinante”, que juntamente com as inovações na microbiologia, imunologia e genética, introduziram uma nova geração de vacinas na indústria farmacêutica: as vacinas recombinantes (KRETZMER, 2002; DELANY *et al.*, 2014).

A Biotecnologia e a Engenharia genética evoluíram a tal ponto que passaram a desenvolver ferramentas que possibilitaram a inserção de genes de interesse em células procaríotas e eucaríotas (FRESHNEY *et al.*, 2010). Esse avanço permitiu desenvolver a estratégia básica para a produção de uma proteína recombinante, que se baseia na capacidade de uma variedade de organismos atuarem como sistemas de expressão, onde o DNA que codifica o determinante antigênico pode ser inserido e posteriormente expresso. As vacinas recombinantes são, portanto, vacinas oriundas de proteínas recombinantes produzidas por esses sistemas de expressão, com adição de compostos adjuvantes (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

A primeira proteína terapêutica licenciada por essa tecnologia foi a insulina recombinante (*Recombinant Insulin, Genentech*), em 1982. Seguido de outros inúmeros

produtos como hormônios, fatores de crescimento, interferons, dentre outros (BUTLER, 2005). Dentre as vacinas, o exemplo clássico de vacina recombinante administrada atualmente em humanos é a vacina contra Hepatite B, e mais recentemente a vacina administrada contra HPV, o papilomavírus humano (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

A maior parte das vacinas recombinantes em fase de desenvolvimento atualmente é oriunda de proteínas recombinantes altamente purificadas ou subunidades de patógenos. Uma ampla variedade de genes de diferentes agentes etiológicos tem sido clonada, expressa e purificada para serem testadas como vacinas. No entanto, inúmeros fatores devem ser levados em consideração na escolha do sistema de expressão, na montagem do vetor e na proteína que deve ser expressa (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Esses fatores serão detalhados no decorrer do presente estudo (vide item 3.4).

No início do século XXI novas abordagens surgiram, como: a imunologia reversa, realizada pela mineração de sequências do genoma, que identifica antígenos de alto rendimento, como utilizado na vacina recombinante contra *Meningococcus* tipo B; as vacinas baseadas em infusão de células do sangue, como a primeira vacina terapêutica recombinante para câncer de próstata (DELANY *et al.*, 2014); as vacinas de DNA, codificantes do gene da proteína de interesse e geradoras de uma resposta imune de grande espectro (ASTRAY *et al.*, 2014 ; YANG *et al.*, 2013) e a construção de vetores virais, baseada na construção de partículas virais com genes heterólogos (antígeno viral em uma VLP com DNA ou RNA recombinante) codificador para expressão de proteínas em culturas celulares e terapia gênica (ASTRAY *et al.*, 2014).

#### 3.2.4 Comparativo entre os tipos de vacinais

Embora efetivas, as vacinas clássicas apresentam algumas desvantagens que foram superadas no desenvolvimento das vacinas recombinantes (DERTZBAUGH, 1998), especialmente em relação à segurança de administração e a indisponibilidade do controle de cepas atenuadas (ASTRAY *et al.*, 2014), bem como devido aos relatos de reações adversas (YANG *et al.*, 2013). A Tabela 2 a seguir, discorre entre as vantagens e desvantagens da utilização dos diferentes tipos de vacina.

**Tabela 2: Características das vacinas com vírus vivo atenuado, vírus inativado e vacinas recombinantes.**

	<b>Vacina com vírus vivo atenuado</b>	<b>Vacina com vírus inativado</b>	<b>Vacinas recombinantes</b>
Data de início	A partir do século XVIII	A partir do século XIX	Final do século XX
Características positivas	-Baixa carga viral por dose; - Forte resposta imune tanto humoral quanto celular.	-Diminuição nos efeitos colaterais em relação à vacina com vírus atenuado.	- Mutações específicas podem ser introduzidas no genoma mantendo a propriedade imunogênica, porém deixando-o não patogênico.
Características negativas	- Risco de desenvolvimento da doença induzida pela vacina; - Elevadas reações pós-vacinação; - Lesão genética responsável pela atenuação indefinida.	- Reversão do agente toxóide para sua forma tóxica, necessidade de teste de segurança para o agente. - Reações pós-vacinação	- Proteína recombinante isolada apresenta baixa imugenicidade, necessidade de adjuvantes.

Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2012; DERTZBAUGH, 1998; PÉREZ *et al.*, 1997

Entretanto, apesar das vacinas recombinantes oferecerem vantagens mais significantes quando comparadas às vacinas de primeira e segunda geração, elas também apresentam algumas limitações. Uma desvantagem relevante das vacinas recombinantes é o fato de que foi comprovada que a proteína recombinante em sua forma isolada apresenta menor atividade imunogênica em relação às vacinas clássicas (NASCIMENTO *et al.*, 2012; ASTRAY *et al.*, 2014). Uma justificativa para tal fato seria devido ao alto grau de pureza da proteína produzida em comparação com as vacinas tradicionais, em que, ironicamente, os possíveis contaminantes encontrados poderiam auxiliar no desenvolvimento do processo inflamatório no organismo, essencial para iniciar uma forte resposta imune (DERTZBAUGH, 1998). Devido a isso, as proteínas recombinantes necessitam de compostos adjuvantes para a formulação da vacina, que induzem o aumento da resposta imune e consequentemente da proteção do indivíduo (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

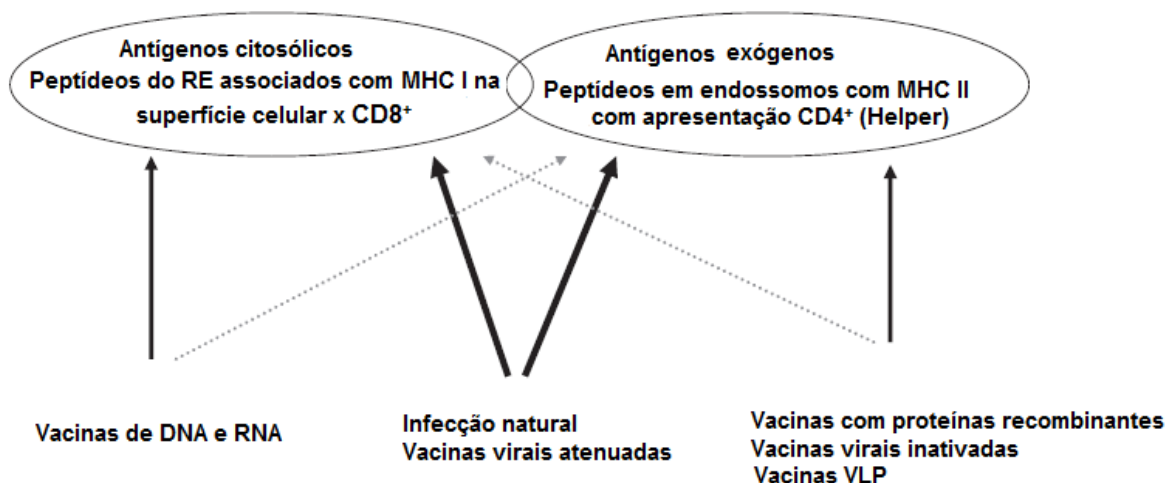
Analisando com mais detalhes a resposta imune dos diferentes tipos de vacinas, como esquematizado na Figura 2, vemos que as vacinas baseadas na infecção viral com vírus atenuado são capazes de induzir uma forte resposta imune, tanto humoral quanto

celular. A resposta imune humoral aos vírus é baseada essencialmente na síntese de anticorpos contra as proteínas estruturais do vírus, por meio da estimulação de antígenos exógenos envolvendo peptídeos nos endossomos, com o MHC classe II e apresentação aos linfócitos T auxiliares  $CD4^+$  (*Helper*). Já a resposta imune celular se baseia essencialmente na ativação dos linfócitos T citotóxicos específicos,  $CD8^+$ , para síntese de proteínas *in vivo* envolvendo o retículo endoplasmático e associação com o MHC classe I (ASTRAY *et al.*, 2014).

Nas condições que mais se aproximariam à imunidade obtida pela infecção direta da doença no organismo, as vacinas atenuadas seriam uma boa escolha, uma vez que garantem que uma forte resposta imune seja gerada por ambos os mecanismos (humoral e celular). No entanto, pelas razões de segurança, qualidade e indisponibilidade de controle das cepas atenuadas fazem com que essa abordagem não seja recomendada. Já as vacinas com vírus inativado, embora se apresentem eficientes contra inúmeras doenças virais, induzem uma resposta imune humoral e uma fraca resposta imune celular (ASTRAY *et al.*, 2014).

Têm sido demonstrados que as vacinas baseadas em proteínas recombinantes apresentam resposta imune induzida essencialmente pela resposta humoral. Por outro lado, vacinas mais recentes como as VLPs ou ainda as vacinas de DNA e RNA induzem uma forte resposta celular e uma fraca resposta humoral. Embora atualmente não tenha disponíveis vacinas humanas de DNA, elas estão previstas para entrarem no mercado farmacêutico como proteínas terapêuticas em breve (ASTRAY *et al.*, 2014).

Figura 2: Resposta imune das vacinas virais.



Fonte: ASTRAY *et al.*, 2014

Novas abordagens baseadas no conhecimento adquirido sobre a biologia do vírus e as questões de segurança abrem espaço para surgimento de novas tecnologias, com a vantagem em relação às vacinas clássicas de serem preparadas em um bioprocessamento controlado e com um antígeno quimicamente definido (ASTRAY *et al.*, 2014; DELANY *et al.*, 2014).

### 3.3 O panorama atual da produção industrial dos biofármacos

O termo biofármaco é utilizado para designar proteínas e substâncias derivadas de ácidos nucleicos, usados com finalidade terapêutica ou para diagnóstico *in vivo* e produzidas por meios que não seja a extração direta de fontes biológicas (MORAES *et al.*, 2008). Desde a aprovação do primeiro biofármaco pelas agências reguladoras, a insulina recombinante em 1982, cresce amplamente a aprovação de diversos outros produtos desse setor (WILSON *et al.* 2012; MIRALLES *et al.*, 2009).

A produção dos biofármacos em larga escala começou a ser possível devido os inúmeros avanços na tecnologia do cultivo de células que permitiram essa produção em nível industrial. Como podemos evidenciar, o estudo de diferentes sistemas de expressão propiciou a geração de altas concentrações da proteína específica em uma cultura prolongada e a caracterização do metabolismo e fisiologia celular permitiu o desenho de processos industriais para serem realizados em biorreatores, que permitem uma melhoria significativa no rendimento do produto fazendo com que o biofármaco consiga ser produzidos na capacidade que a indústria exige (BUTLER, 2005).

Alguns biofármacos são considerados como terapêuticos de elevado custo e a sua demanda é pequena, portanto são produzidos em escala menor. Já produtos como vacinas, anticorpos para uso terapêutico e proteínas recombinantes são produzidos em biorreatores industriais para conseguir atender a demanda necessária (KRETZMER, G., 2002).

O processo de produção de um biofármaco é dividido em duas partes. O processamento *Upstream*, em que ocorre o desenvolvimento, seleção e otimização da linhagem celular, do meio de cultura, das condições cinéticas de cultivo, do biorreator, dos modos de operação e do processo como um todo, o qual tem como objetivo gerar uma concentração robusta do produto, com alta produtividade e qualidade. Já o processamento *Downstream* concentra-se na purificação do produto, em que encontramos diversas abordagens que podem ser realizadas em etapas sequenciais, como as cromatografias, que buscam ir purificando sequencialmente o produto até conseguir isolar e concentrar o



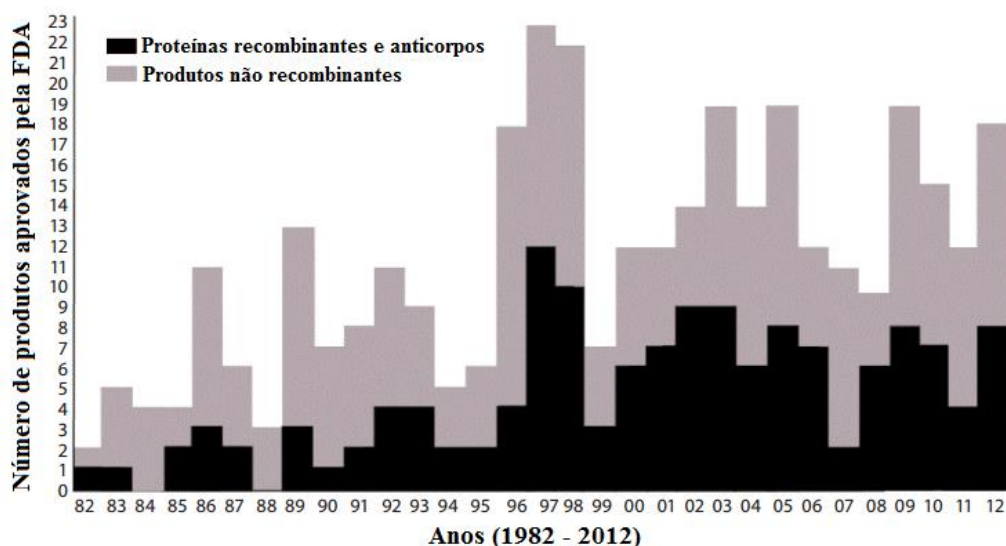
insumo farmacêutico final de interesse (GRONEMEYER *et al.*, 2014). O processamento *downstream* pode representar de 45 a 92% do custo total de fabricação de uma proteína recombinante, e devido a esse relevante valor, o desenvolvimento de uma estratégia de purificação econômica e eficiente se apresenta como um dos grandes desafios propostos aos pesquisadores e a indústria. (SARASWAT *et al.*, 2013).

Nos últimos trinta anos, além de ter ocorrido um rápido aumento no número dos produtos biofarmacêuticos aprovados, a demanda de produção pelas indústrias farmacêuticas nesse setor tem crescido consideravelmente. Atualmente cerca de um terço das aprovações anuais concedidas pela agência reguladora dos Estados Unidos, FDA são para biofármacos (WILSON *et al.*, 2012).

Em relação ao investimento destinado na área de pesquisa da indústria farmacêutica, bem como ao orçamento destinado à pesquisa nos produtos que já estão em fase de teste, mais de 40% do orçamento atual são direcionadas as pesquisas do setor dos biofármacos (RADER, 2013).

A Figura 3 evidencia o gráfico dos produtos aprovados pela FDA de 1982 a 2012 subdivididos entre os produtos recombinantes e os produtos convencionais. É demonstrado o crescimento da demanda por esses produtos pela indústria farmacêutica, o que realça a importância da pesquisa científica nessa área (RADER, 2013).

Figura 3: Aprovação dos biofármacos pela FDA de 1982 a 2012.



Fonte: Adaptado de Rader, 2013.

No ano de 2012, a FDA concedeu 18 aprovações para novos biofármacos, dentre os quais oito desses são proteínas recombinantes e dois são anticorpos monoclonais (RADER, 2013). Em 2013, foram aprovados nos Estados Unidos e na União Europeia 20 novos produtos moleculares biofarmacêuticos, definidos pela FDA como produtos contendo proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais ou outros produtos à base de ácidos nucleicos biossintetizados. Dentre esses produtos temos quatro anticorpos monoclonais, quatro hormônios, três fatores sanguíneos, três subunidades para vacinas, dois fatores de crescimento, dentre outros produtos e algumas enzimas (WALSH, 2014), como podemos visualizar na Tabela 3, encontrada a seguir:

**Tabela 3: Biofármacos aprovados em 2013 nos Estados Unidos (EUA) e na União Europeia (EU).**

<b>Produto</b>	<b>Organismo</b>	<b>Proteína</b>	<b>Indicação Terapêutica</b>	<b>Empresa Responsável</b>
Bexsero	Bactéria <i>E. coli</i>	Vacina com múltiplos componentes	Doença meningocócica invasiva	Novartis, 2013 (UE)
Flublok	Célula de inseto	Hemaglutinina do vírus influenza	Influenza	Protein Sciences Corporation, 2013 (EUA)
Gazyva	Célula CHO	mAb engenheirado em linfócito B	Leucemia linfocítica crônica	Roche - Genentech, 2013 (EUA)
Grastofil	Bactéria <i>E. coli</i>	Fator estimulatório granulócito	Netropenia	Apotex, 2013 (EUA)
Hexacima/ Hexyon	Levedura <i>Hansenula polymorpha</i>	Vacina multicomponente	Contra inúmeros patógenos e toxinas	Sanofi Pasteur
Inflectra/ Remsima	Célula de mamífero Sp2/0	mAb quimérico específico para Fator- $\alpha$ de necrose tumoral	Artrite, colite, doença de Crohn, psoríase, outros	Hospira/ Celltrion, 2013 (UE)
Jetrea	Levedura <i>P. pastoris</i>	Enzima plasmina humana	Adesão/tração vitreomacular e vítreo-retiniana	Thrombo Genics, 2013 (UE) e 2012(EUA)
Kadcyla	Célula CHO	mAb humanizado específico para HER-2	Câncer de mama	Roche - Genentech, 2013 (UE e USA)

<b>Produto</b>	<b>Organismo</b>	<b>Proteína</b>	<b>Indicação Terapêutica</b>	<b>Empresa Responsável</b>
Krystexxal	Bactéria <i>E. coli</i>	Enzima urato-oxidase	Gota	Savient, 2013 (UE) e 2010 (EUA)
Lonquex	Bactéria <i>E. coli</i>	Fator de estimulação de granulócitos	Neutropenia	Teva, 2013 (UE)
NovoEight	Célula CHO	Fator VIII modificado	Hemofilia A	Novo, 2013 (UE e USA)
Ovaleap	Célula CHO	Biossimilar ao hormônio FSH	Infertilidade e subfertilidade	Teva, 2013 (UE)
Perjeta	Célula CHO	mAb humanizado específico para HER-2	Câncer de mama	Roche - Genentech, 2013 (UE) e 2012 (EUA)
Provenge	Células humanas do próprio paciente	Vacina desenvolvida a partir das células brancas do sangue periférico de cada paciente	Câncer de próstata avançado	Dendreon, 2010 (USA)
Rixubis	Célula CHO	Fator IX de coagulação	Hemofilia B	Baxter, 2013 (EUA)
Ryzodeg	Levedura <i>S. cerevisiae</i>	Combinação de duas insulinas engenheiradas	Diabetes	Novo, 2013 (UE)
SomatropinBio partners	Levedura <i>S. cerevisiae</i>	Hormônio GH	Falha no crescimento e deficiência no hormônio de crescimento	BioPartners GmbH, 2013 (UE)
Tresiba	Levedura <i>S. cerevisiae</i>	Actina longa humana engenheirada análoga à insulina	Diabetes	Novo, 2013 (UE)
Tretten	Levedura <i>S. cerevisiae</i>	Subunidade A do fator XIII de coagulação	Deficiência congênita na subunidade A do fator XIII e coagulação	Novo, 2013 (EUA) e 2012 (UE)
Zaltrap	Célula CHO	Combinação de proteínas fusionadas com diferentes domínios	Câncer colorretal metastático	Regeneron/Sanofi-aventis, 2013 (UE) e 2012 (EUA)

Fonte: Adaptada de WALSH (2014).

Dessa forma, evidenciada a crescente demanda pelos biofármacos, consolidamos a necessidade de investimento em pesquisa para produção desses produtos biofarmacêuticos. A pesquisa se concentra principalmente no desafio de desenvolver e otimizar um processo laboratorial de produção que consiga quantidade purificada suficiente do produto de interesse, para posteriormente transferi-lo para a escala industrial (GRONEMEYER *et al.*, 2014; BUTLER *et al.*, 2005; KRETZMER, G., 2002).

### 3.4 O vírus rábico, a glicoproteína G e a importância da glicosilação

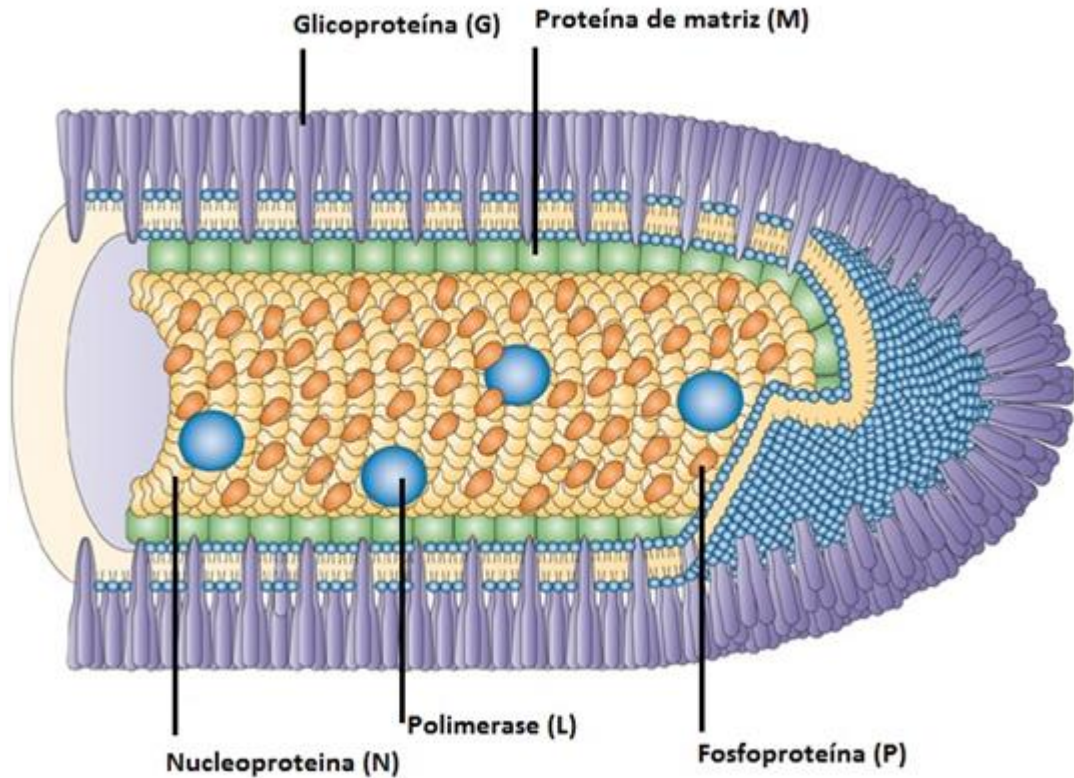
O agente etiológico causador da raiva é o vírus rábico, pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. O vírus rábico (Figura 4) possui 120-250 nm de tamanho e é composto por duas partes: um nucleocapsídeo interno helicoidal e um envelope lipídico que o caracteriza como vírus envelopado (KING *et al.*, 2011). O material genético do vírus é composto de RNA *antisense* com 12 kb de comprimento que compõe cinco genes para codificação de apenas cinco proteínas: uma nucleoproteína (proteína N); uma fosfoproteína (Proteína P); uma proteína de matriz (Proteína M); uma glicoproteína (Proteína G) e uma RNA-polimerase (Proteína L). As proteínas N, P e L constituem o nucleocapsídeo e em conjunto com o RNA genômico viral formam o complexo ribonucleoproteico. As proteínas M e G envolvem o ribonucleoproteico e juntas constituem o envelope viral, como evidenciado abaixo (MASATANI *et al.*, 2010).

As proteínas N, P e L constituem o nucleocapsídeo de forma que a proteína N (58-62kDa) é uma fosfoproteína que apresenta alta especificidade para englobar o RNA viral e formar o complexo ribonucleoproteico de forma eficiente, o que proporciona o molde para a transcrição do RNA e a replicação pelo complexo polimerase do vírus, que incluem as proteínas P e L. A proteína P (35-40 kDa) também é uma fosfoproteína que é fosforilada por certos isômeros de proteína quinase C e apresenta a relação entre N e P de 2:1, o que sugere que por vírus, duas moléculas de N interagem com uma molécula de P. A terceira proteína do complexo que forma o nucleocapsídeo (proteína L) é uma RNA-polimerase (subunidades: 65-80 kDa e 190 kDa) e que portanto, apresenta função associada a síntese de RNA genômico viral (KING *et al.*, 2011; KOSER *et al.*, 2004.)

As proteínas M e G envolvem o complexo ribonucleoproteico e juntas constituem o envelope viral de forma que a proteína M, conhecida por ser a proteína de matriz, atua como uma ponte entre a membrana e o envelope viral, preenchendo o domínio citoplasmático da proteína G, que é incorporado na membrana do vírus derivado da célula

hospedeira. Essa proteína permanece na forma não fosforilada (KING *et al.*, 2011; KOSER *et al.*, 2004; SCHNELL *et al.*, 2010).

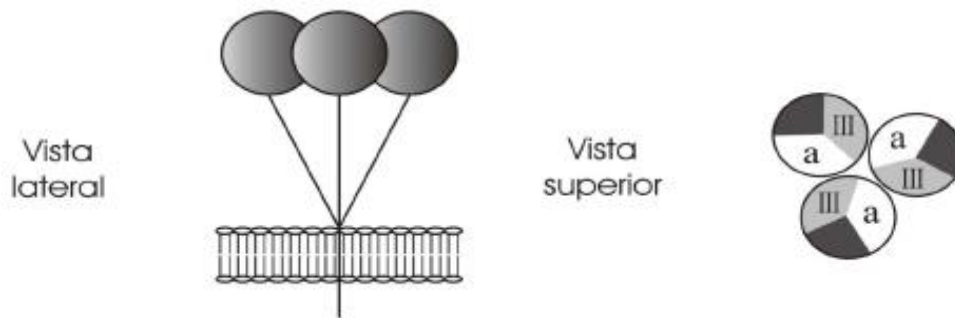
Figura 4: Estrutura do vírus rábico evidenciando suas cinco proteínas principais.



Fonte: SCHNELL *et al.*, 2010.

A proteína G, denominada RVGP é a única glicoproteína transmembranar da estrutura do vírus rábico (SCHNELL *et al.*, 2010) e é a principal responsável por induzir a resposta imune no indivíduo (ASTRAY *et al.*, 2013). Ela está presente no envelope do vírus, que é circundada pelo RNA negativo viral envolto pela proteína do nucleocapsídeo (ASTRAY *et al.*, 2013) e é composta de quatro domínios distintos, sendo eles o domínio de sinal (não-estrutural), o domínio transmembranar, o domínio citoplasmático e o quarto domínio que são de fato três domínios ecto-glicosilados, expostos como trímeros projetados através da membrana na superfície viral, demonstrados na Figura 5 (KING *et al.*, 2011). A molécula completa da glicoproteína possui 505 aminoácidos, com 44 no domínio citoplasmático, 22 aminoácidos no domínio transmembranar e os 439 aminoácidos restantes estão expostos na forma do trímero descrito. Seu peso molecular é aproximadamente 65 kDa. (GAUDIN *et al.*, 1992).

Figura 5: Esquema demonstrando os domínios da glicoproteína do vírus da raiva.



Fonte: Sissoeff *et al.*, 2005.

Após a infecção, a polimerase viral transcreve o RNA viral diretamente do genoma, gerando mRNAs monocistrônicos adenilados e metilados. A tradução ocorre nos poliribossomos, exceto a RVGP, que é traduzida e glicosilada na membrana do retículo endoplasmático associada aos poliribossomos (ASTRAY *et al.*, 2013). Desse modo, com o intuito de conferir a imunidade ao indivíduo, a RVGP necessita da glicosilação como modificação pós-traducional, devendo ser oligomerizada e apresentar o sítio antigênico III, que é desenvolvido após o complexo pós-traducional de modificações (ASTRAY *et al.*, 2013)

A glicosilação é uma modificação pós-traducional que requer uma série de etapas de processamento realizadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (MORAES *et al.*, 2008). É a modificação que permite que os oligossacarídeos se liguem às proteínas através de uma ligação covalente, formando as glicoproteínas. Existem três tipos de glicosilação: a N-glicosilação, na qual os glicanos estão ligados em um resíduo de asparagina, na sequência consenso “Asn-Xaa-Ser/Thr”; a O-glicosilação, em que o glicano está ligado em um resíduo de serina ou treonina e a sequência consenso não pode ser determinada; a C-glicosilação, na qual a ligação ocorre com o triptofano, a qual existe poucos estudos e é limitado o conhecimento sobre sua importância biológica (PALOMARES *et al.*, 2004).

A glicosilação é a alteração pós-traducional que apresenta maior ocorrência dentre as proteínas terapêuticas, em que 50% das proteínas humanas encontram-se na forma glicosilada. Os defeitos gerados no processo de glicosilação pode não ter efeitos nas células em cultura, porém podem ser fatais no organismo quando completo. Essa modificação pós-traducional específica é necessária por inúmeras proteínas por ser

responsável pelo reconhecimento de regiões específicas, como reconhecimento endógeno e exógeno (PALOMARES *et al.*, 2004).

Algumas glicosilações são sutis enquanto outras são requeridas para o desenvolvimento, função e sobrevivência do organismo. Diversas funções estão relacionadas com a glicosilação, de forma específica, como as importantes funções regulatórias e estruturais, como o correto enovelamento, transporte, estabilidade, solubilidade, atividades específicas, reconhecimento de anticorpos e resistência a proteases encontradas em solução. Portanto, na produção de proteínas recombinantes que necessitam dessa modificação, a correta glicosilação é uma etapa importante do processo, pois preserva e mantém sua função biológica (WOJCZYK *et al.*, 1998; PALOMARES *et al.*, 2004).

Na sequência prevista da proteína RVGP encontramos três potenciais sítios aceptores para N-glicosilação, dos quais apenas um ou dois são glicosilados (GAUDIN *et al.*, 1992). Não há dados descritos sobre O-glicosilação na proteína do vírus da raiva (WOJCZYK *et al.*, 1998). A RVGP é a única proteína glicosilada, com oligossacarídeos de cadeia ramificada que são responsáveis por alcançar cerca de 10 a 12% da massa total da proteína (KING *et al.*, 2011).

Outro importante parâmetro para análise da RVGP que deve ser mencionado é o controle do pH, visto que dependendo do valor, ela pode ter alteração de conformação para três diferentes estados que influenciam diretamente na atividade da proteína (GAUDIN *et al.*, 2002), que serão explorados no item 5.1.3.

### **3.5 Células do inseto *Drosophila melanogaster* S2**

O cultivo de células de inseto teve início em 1915 e no ano de 1962 foi estabelecida a primeira linhagem capaz de se replicar indefinidamente (MORAES *et al.*, 2008), a qual teve origem no tecido ovariano de uma mariposa, *Antheraea eucalypti* (ATCC Organization).

Dentre as células de inseto amplamente cultivadas *in vitro* podemos citar: Sf-9, células do ovário de pupa da borboleta *Spodoptera frugiperda*, muito utilizada para expressão com emprego do baculovírus como vetor; a linhagem High Five™, células do lepidóptero *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4-High Five™), reconhecida por sua alta capacidade de expressar altos níveis de proteínas recombinantes quando comparada à Sf-9; e as linhagens S2 e S3 (MORAES *et al.*, 2008; ATCC Organization).

As linhagens de células S2 e S3 foram desenvolvidas por Schneider e têm sido bastante utilizadas para expressão de genes heterólogos. Ambas as linhagem são células semi-aderentes derivadas de uma população de moscas de *Drosophila melanogaster* em estágio embrionário tardio de desenvolvimento (MORAES *et al.*, 2008; FRESHNEY *et al.*, 2010). A linhagem S2 foi desenvolvida por Schneider em 1969 a partir de centenas de embriões com 20 a 24h de vida (FRESHNEY *et al.*, 2010) e muitas características das células sugerem que ela é uma linhagem derivada de macrófago e de morfologia epitelial (INVITROGEN, 2015). A imagem A da Figura 6 evidencia o inseto *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como “mosca-da-fruta” e a imagem B da mesma figura evidencia as células S2 vistas no microscópio óptico.

Figura 6: Foto do inseto *Drosophila melanogaster* (A) e das células *Drosophila melanogaster* S2 em cultivo (B) na forma isolada e na forma de aglomerados celulares, visualizadas pelo microscópio óptico em hematocitômetro.



Fonte: Fotografia do inseto *Drosophila melanogaster* (A) por Rocha *et al.*, em 2015, no Laboratório de Mutagênese - ICB/UFMG e fotografia do acervo pessoal das células *Drosophila melanogaster* S2 pelo microscópio óptico em hematocitômetro.



### 3.5.1 Sistemas de expressão e a cultura de células de insetos

As produções comerciais de proteínas recombinantes são tradicionalmente realizadas em bioprocessos, de fermentações bacterianas a produções baseadas em cultivo de células animais, em que a escolha do sistema de expressão é um importante fator de sucesso do desenvolvimento do processo como um todo. Devido a intensa demanda atual pela redução do custo de produção e obtenção de proteínas recombinantes de alto rendimento, as limitações e vantagens de cada abordagem devem ser levadas em consideração para culminar na escolha adequada do sistema de expressão. Dessa forma, fatores como custo, escalabilidade, rendimento, estratégias de purificação, segurança, bem como as características do produto e do sistema, devem ser estudados a fim de possibilitar a realização do desenvolvimento do bioprocessos em sua forma mais produtiva (CHA *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2012).

Os sistemas de expressão mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes são: bactérias, leveduras, células de plantas e células animais (insetos e mamíferos). Cada um desses sistemas possui suas variações em uma série de características e sua escolha deve ser realizada seguindo as exigências requeridas do produto de interesse, fator essencial que garantirá sua atividade biológica, e de acordo com os parâmetros do bioprocessos que serão empregados. Além disso, os atributos dos sistemas de expressão podem variar de um organismo para o outro, devido as características específicas de cada organismo. (MORAES *et al.*, 2008; CHA *et al.*, 2005).

A Tabela 4 a seguir faz uma comparação entre diversas características gerais dentre os cinco sistemas de expressão utilizados, em que vale ressaltar o fato de que algumas características poderem se alterar, dependendo da complexidade da proteína que está sendo produzida.

**Tabela 4: Comparação dos sistemas de expressão de proteínas recombinantes.**

	<b>Bactéria</b>	<b>Levedura</b>	<b>Planta</b>	<b>Inseto</b>	<b>Mamífero</b>
Dificuldade das técnicas de cultivo	Baixa	Baixa	Moderado	Moderada à elevada	Elevada
Resistência do organismo às condições adversas de cultivo	Elevada	Elevada	Moderada	Moderada à baixa	Baixa
Taxa de crescimento	Elevada	Elevada	Elevado à moderado	Moderada à baixa	Moderada à baixa
Produtividade e rendimento de expressão	Elevada	Elevada	Moderada à baixa	Moderada	Moderada à baixa
Custo do processo global	Baixo	Baixo	Baixo à moderado	Moderado à elevado	Elevado
Capacidade de realizar modificações pós-traducionais	Baixa	Moderada	Moderada	Moderada	Elevada
Glicosilação simples e complexa	Não/Não	Sim/Não	Sim/Não	Sim/Sim*	Sim/Sim
Capacidade de Secreção	Moderada	Elevada	Moderada (restrição de tamanho)	Elevada	Elevada
Funcionalidade da proteína expressa (depende da complexidade proteica)	Moderada	Moderada	Moderada	Elevada	Elevada
Qualidade dos sistemas gênicos disponíveis	Elevada	Moderada à elevada	Moderada	Moderada	Moderada
Sensibilidade ao cisalhamento	Baixa	Baixa	Moderada	Moderada à elevada	Moderada à elevada

\*Os perfis de glicosilação de mamíferos e de insetos são diferentes e são percorridos no decorrer do estudo. Fonte: Adaptado de MOHAMED, 2015; SWIECH *et al.*, 2007; CHA *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012.

Nos últimos anos diversos biofármacos obtidos via linhagens de insetos foram licenciados para uso humano e veterinário. A Tabela 5 descreve os produtos licenciados e as linhagens utilizadas de 2002 a 2013 desenvolvidos pelo sistema baculovírus, em que a produção de vacinas com a célula de inseto e esse sistema inclui vantagens relacionadas

ao tempo de processo curto (5 ou 6 dias) e a incapacidade do baculovírus para infectar humanos (MOHAMED, 2015). Em termos de custos do processo, um ambiente de nível de Biossegurança 1 é suficiente para realizar a produção dessas vacinas, uma vez que não são replicantes e não são patógenos, devido sua completa falta de DNA e RNA, mas com alta imunidade protetora. Essas vantagens significam custos de instalações, operações, materiais e infraestrutura mais amenos quando comparados a um ambiente de nível de Biossegurança 2.

**Tabela 5: Produtos farmacêuticos obtidos e licenciados com linhagens de insetos para uso humano ou veterinário.**

Nome do produto	Tipo do produto	Ano licenciado	Proteína	Linhagem de inseto
Bayovac®CFS	Vacina	2002	gEnv E2	Sf-9
Porcilis®	Vacina	2004	gEnv E2	Sf-9
Porcilis® PCV	Vacina	2004	ORF2	Sf-9
Cervaxix®	Vacina	2007	L1	High Five®
Ingelvac Circoflex®	Vacina	2009	ORF2	ExpresSF + ® <sup>a*</sup>
Provenge® (Dendreon)	Imunoterapia para câncer de próstata	2010	Fator estimulatório PAP-GMCSF	Sf-21
Best-H5®	Vacina para gripe aviária H5N1	2012	Hemaglutinina do vírus influenza	ExpresSF + ® <sup>a*</sup>
Glybera®	Terapia gênica para enzima LPL	2012	Vetor associado a adenovírus tipo 1	ExpresSF + ® <sup>a*</sup>
Flublok®	Vacina para gripe sazonal	2013	Hemaglutininas do vírus influenza, H1, H3 e B	ExpresSF + ® <sup>a*</sup>

\* ExpresSF + ®<sup>a</sup> é uma linhagem derivada da Sf-9, de propriedade da *Protein Sciences Corporation*. Produtos farmacêuticos obtidos e licenciados com linhagens de insetos para uso humano ou veterinário pelo sistema Baculovírus. Fonte: Adaptado de MOHAMED, 2015.

Como esses sistemas de expressão se mostraram ferramentas promissoras para obtenção dos biofármacos e diversos produtos estão sendo licenciados a partir do cultivo de células de insetos, a glicoproteína do vírus da raiva tem sido amplamente estudada para aprimorar os níveis de expressão obtidos pelos diferentes sistemas. Dessa forma, a Tabela 6 descreve os diversos sistemas de expressão já avaliados para a produção da rRVGP.

**Tabela 6: Sistemas de expressão já utilizados para a expressão da glicoproteína do vírus rábico.**

Sistema de expressão	Célula	Produção da RVGP	Conclusões	Autores
Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	n.d.	Falta na atividade imunogênica	SAKAMOTO <i>et al.</i> , 1999
Levedura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30-40 ng/mL	Produzida incorretamente	SAKAMOTO <i>et al.</i> , 1999
Planta	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,001-0,38% do total protéico das folhas	rRVGP com diferença no peso molecular devido aos diferentes perfis de glicosilação	ASHRAF <i>et al.</i> , 2005
Mamífero	BHK-21 com infecção pelo vírus	n.d.	Expressão parcial de rRVGP e mudanças conformacionais	MAILLARD E GAUDIN, 2012
Mamífero	CHO-K1	n.d.	Expressão satisfatória e adequada imunogenicidade	WOJCZYK <i>et al.</i> , 1998
Inseto	Sf-9 com infecção por baculovírus	n.d.	Alta imunogenicidade	DRINGS <i>et al.</i> , 1999
Inseto	S2 Linhagem AcRVGP2K	136 ng/mL	Melhoria nas estratégias de cultivo propiciaram o aumento da rRVGP	SWIECH, 2008
Inseto	S2 Linhagem PMtRVGPHy	Até 5,5 $\mu\text{g}/10^7$ cel	Estratégias de construção de diferentes vetores	LE MOS <i>et al.</i> , 2009
Inseto	S2 Linhagem S2MtRVGP-H	2,5 mg total produzido 1,6 $\mu\text{g}/10^7$ cel	<i>Bioflo 110</i> com $V_{\text{trabalho}}=1\text{L}$ . Resultados promissores.	VENTINI <i>et al.</i> , 2010
Inseto	S2 Linhagem S2MtRVGP-H-His	1 mg total produzido 0,6 $\mu\text{g}/10^7$ células	<i>Bioflo 110</i> $V_{\text{trabalho}}=1\text{L}$ Cauda de Histidina para ensaios de purificação	VENTINI <i>et al.</i> , 2010
Semliki Forest Virus - SFV	BHK-21	1,8-2,2 $\mu\text{g}/10^6$ cel	Alta produtividade. Sistema estável e reproduzível	BENMAAMAR <i>et al.</i> , 2008

Fonte: Adaptado de ASHRAF *et al.*, 2005; SWIECH *et al.*, 2008; SAKAMOTO *et al.*, 1999; VENTINI *et al.*, 2010; WOJCZYK *et al.*, 1998.

Como visto o enfoque utilizando o sistema de expressão em células S2 na Tabela 6, criou-se uma plataforma de estudo entre o Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan em conjunto com outros laboratórios de outras instituições de pesquisa com o objetivo de obtenção da glicoproteína para fins de diagnóstico, vacinal e para ensaios de purificação. Dessa forma, várias condições de cultivo têm sido estudadas, analisadas e aprimoradas, o que têm levado ao aumento significativo da concentração de glicoproteína obtida por esse sistema (VENTINI *et al.*, 2010, 2014; SWIECH *et al.*, 2007, 2008).

Pode-se notar na Tabela 6 que apesar da linhagem S2MtRVGP-H-His ter sido desenvolvida após a linhagem S2PMtRVGPHy, ela demonstra resultados bem inferiores, 0,6  $\mu\text{g}/10^7$  células e 5,5  $\mu\text{g}/10^7$  células, respectivamente. No entanto, a linhagem S2PMtRVGPHy apresentava grandes dificuldades de purificação ao final do processo, o que prejudicaria a obtenção da glicoproteína com a pureza necessária. Esse fato impulsionou o desenvolvimento de uma linhagem que possibilitasse a purificação da rRVGP e a linhagem S2MtRVGP-H-His foi desenvolvida (VENTINI *et al.*, 2010). Essa nova linhagem foi estabelecida com a cauda de histidina “His”, componente frequentemente utilizado que possibilita a purificação de produtos recombinantes, a qual exibe uma elevada afinidade para íons metálicos. A utilização da cauda de histidina tem demonstrado na literatura uma recuperação de 90% do produto de interesse em um único passo quando utilizadas com uma matriz com o grupo disponível para a ligação como o IMAC (*Immobilised metal affinity chromatography*). Essa estratégia tem sido comumente utilizada nos dias atuais tanto nas pesquisas acadêmicas como na indústria (SARASWAT *et al.*, 2013).

Devido a necessidade de garantir a atividade biológica da glicoproteína, característica essencial que resultará na sua adequada atividade imunogênica (MORAES *et al.*, 2008), analisamos os diferentes perfis de glicosilação dos sistemas de expressão evidenciados na Tabela 4 e na Tabela 6.

A análise evidencia que a rRVGP produzida na bactéria *Escherichia coli* apresentou falta da atividade imunogênica. Isso se deve ao fato da ausência desses organismos em realizar a correta modificação pós-traducional, necessária para a atividade da glicoproteína. Bactérias não realizam glicosilações simples ou complexas e por esse motivo não são indicadas para atuarem como sistemas de expressão de proteínas recombinantes que necessitam dessa modificação pós-traducional, sugerindo, portanto, a utilização de veículos mais adequados (SAKAMOTO *et al.*, 1999; FRESHNEY *et al.*, 2010).

Leveduras são os microrganismos mais utilizados para a produção de antígenos virais devido sua capacidade de gerar sua forma glicosilada, (SAKAMOTO *et al.*, 1999) produzindo predominantemente elevadas estruturas de manose (MOHAMED, 2015). Os antígenos virais de superfície do vírus da hepatite tipo B, produzido por células de levedura, demonstraram apropriada atividade imunogênica e foram aplicados com sucesso para o desenvolvimento da vacina recombinante contra a hepatite B. Essa nova vacina substitui grande parte das antigas vacinas que foram produzidos a partir de materiais de sangue humano infectado. No entanto, especificamente para a produção da glicoproteína do vírus da raiva, como visto na Tabela 6, Sakamoto *et al.* (1999) evidenciaram que a proteína não foi produzida da forma apropriada.

Células de plantas são capazes de realizar glicosilação em estágios mais iniciais, em uma abordagem menor que os vertebrados, possuindo açúcares adicionais como xilose e 1,3-fucose (MOHAMED, 2015). Trabalhos realizados com células da folha do tabaco e do tomate demonstraram que a rRVGP apresentou maior peso molecular em relação a *E. coli* e menor em relação a produção com células animais, devido aos diferentes perfis de glicosilação dentre os diferentes sistemas de expressão (ASHRAF *et al.*, 2005). Desse modo, a produção da rRVGP com células de plantas não demonstrou garantia quanto a realização da glicosilação de forma satisfatória.

As células de inseto podem desempenhar a maioria das modificações pós-traducionais presentes em proteínas de origem eucariótica, inclusive a glicosilação. Os diferentes trabalhos evidenciados na Tabela 6 demonstraram a expressão satisfatória, com alta imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva produzidos nesses sistemas. Além disso, a melhoria das condições de cultivo bem como construção vetores moleculares mais eficientes têm permitido a obtenção de quantidades de rRVGP cada vez mais significantes (SWIECH *et al.*, 2007, 2008; VENTINI *et al.*, 2010, 2014; LEMOS *et al.*, 2009; DRINGS *et al.*, 1999).

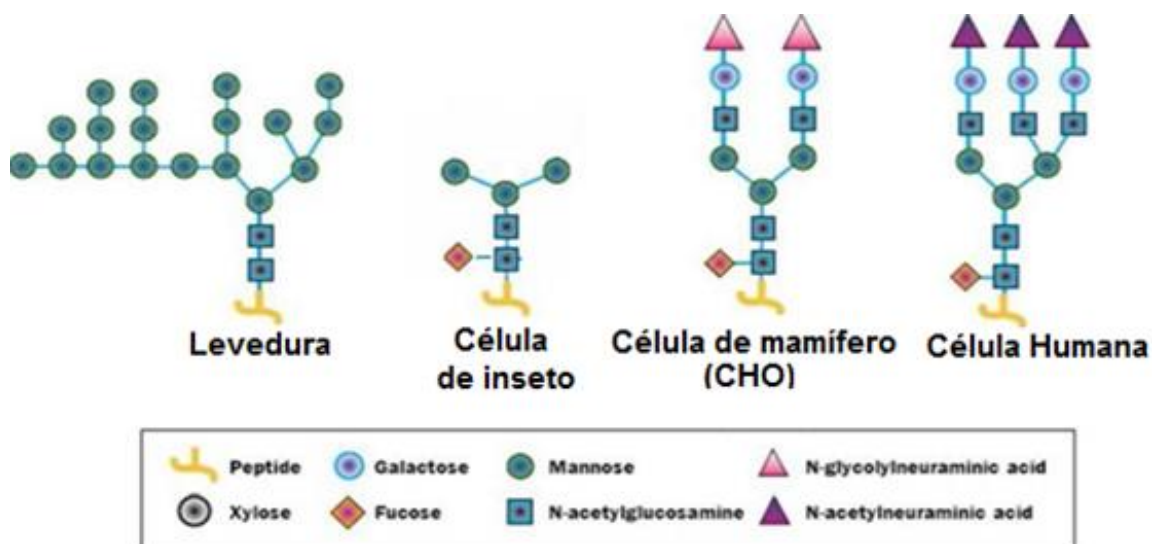
No entanto, na comparação dos padrões de glicosilação entre a célula de inseto e a célula de mamífero, notamos que a célula de inseto é capaz de desempenhar a glicosilação em padrões bem mais limitados (MORAES *et al.*, 2008), especificamente possuindo curtos glicanos de manose (paucimanose), adicionando precursores em sítios apropriados e utilizando suas enzimas necessárias para modificação de oligossacarídeos específicos (MOHAMED, 2015).

Essas limitações da célula de inseto relacionadas à glicosilação têm restringido seu uso na produção de produtos terapêuticos para uso em humanos que necessitam dessa

modificação de forma mais elaborada. Isso faz com que alguns biofármacos tenham a necessidade de serem obtidos através das células de mamíferos, células essas que possuem a capacidade de oferecer um padrão de glicosilação muito similar ao padrão de proteínas humanas nativas (MORAES *et al.*, 2008). Devido a isso, uma abordagem em estudo em desenvolvimento está na manipulação genética dos sistemas baseados em insetos na tentativa de melhorar a maquinaria de glicosilação para produzir glicoproteínas “humanizadas” (MORAES *et al.*, 2008).

Desse modo, leveduras, fungos filamentosos, células de plantas e células de inseto são capazes de promover a glicosilação de proteínas, sendo que as células de inseto apresentam padrões de glicosilação mais adequados que leveduras e bactérias, porém mais limitados que as células de mamíferos, em que os glicanos produzidos por essas células diferem significativamente daqueles presentes em glicoproteínas de mamíferos (MORAES *et al.*, 2008). Portanto, dependendo da proteína a ser produzida, os padrões de glicosilação realizados pelas células de inseto podem não corresponder aos necessários pela proteína específica (MORAES *et al.*, 2008; MOHAMED, 2015). A Figura 7 apresenta um esquema evidenciando as diferentes complexidades do padrão de glicosilação encontrado em diferentes tipos celulares.

Figura 7: Esquema do padrão de glicosilação em diferentes tipos celulares.



Fonte: Adaptado de VARKI *et al.*, 2009.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos dos trabalhos evidenciados nas Tabelas 4, 5 e 6 discorridos acima, notamos que os sistemas de expressão mais adequados

para a expressão de rRVGP são através do cultivo de células de insetos ou células de mamíferos. Dessa forma a Tabela 7 encontrada a seguir evidencia o estudo comparativo entre as condições de cultivos necessárias às células de inseto e às células de mamíferos:

**Tabela 7: Comparativo de condições de cultivo entre insetos e mamíferos.**

	<b>Insetos</b>	<b>Mamíferos</b>
Dificuldade na manutenção da linhagem celular	Moderada à elevada	Elevada
Versatilidade de suspensão e adesão	Fácil devido a característica de ser considerada semi-aderente.	Adaptação à suspensão possível. Utilização de microcarregadores e formação de agregados celulares
Inibição por contato	Amena ou ausente, porém dependente de inóculo mínimo.	Presente, exceto algumas linhagens transformadas e linfoblastóides
Desprendimento da superfície do suporte	Agitação branda	Tripsinização
Crescimento em meio livre de soro	Adaptação possível com maior facilidade.	Adaptação possível com menor facilidade.
Crescimento até altas densidades	Fácil	Difícil devido à inibição por contato.
Dependência de CO <sub>2</sub>	Não depende	Depende
Temperatura de incubação	Baixa (28°C)	Alta (37°C)
Susceptibilidade a mudanças de pH, OD, pressão osmótica	Moderada	Alta
Dependência de inóculo para crescer	Sim	Em geral não, depende da linhagem
Assepsia	Requerida	Requerida
Aprovação FDA para biofármacos provenientes de produtos celulares	Sim, menor número de biofármacos aprovados.	Sim, maior número de biofármacos aprovados.

Fonte: Adaptado de MORAES *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2007; de MOHAMED, 2015.

Evidenciada a facilidade e versatilidade das condições de cultivo das células de inseto em relação às células de mamíferos pela Tabela 7, bem como os diferentes trabalhos demonstrando a expressão satisfatória com alta imunogenicidade da rRVGP utilizando as células de inseto como sistema de expressão (Tabela 6), notamos que a escolha de células de inseto para a produção da glicoproteína do vírus da raiva se apresenta como uma opção muito promissora.



### 3.5.2 Expressão da glicoproteína rRVGP em células S2

Diferentes trabalhos demonstraram a capacidade das células S2 de ser modificada geneticamente e de expressar proteínas heterólogas de modo estável (SWIECH *et al.*, 2008; ASTRAY *et al.*, 2013). A obtenção de linhagens estavelmente transfectadas pode ser feita pela co-transfecção dos vetores contendo o gene da proteína de interesse e um vetor auxiliar codificante para um gene de resistência. Os vetores de resistência mais utilizados são o gene da resistência à higromicina ou à puromicina (ASTRAY *et al.*, 2013)

O sistema de expressão *Drosophila* (DES®) consiste em vetores de expressão e seleção de células S2 e foi estabelecido pela empresa Invitrogen, nos anos 90. (INVITROGEN, 2015). Os vetores contêm elementos necessários para amplificação em bactéria e para expressão do gene de interesse em células S2, que quando integrados no genoma da célula hospedeira, ocorre a replicação do cDNA heterólogo e expressão da proteína pela maquinaria celular (INVITROGEN, 2015).

Os sistemas de expressão em células de *Drosófilas* têm obtido sucesso produzindo um elevado nível de expressão em proteínas heterólogas. Esses sistemas utilizam-se de eficientes promotores gênicos e elevado número de cópias de plasmídeos por célula transfectada. Uma característica relevante das células S2 é a possibilidade de integração de elevado número de cópias do sistema em apenas um evento de transfecção e seleção (ASTRAY *et al.*, 2013), formando matrizes com cerca de 1000 cópias, característica importante que reduz o tempo necessário para amplificação do plasmídeo e seleção das células clonadas para se estabelecer uma linhagem com altos níveis de expressão do gene induzido (INVITROGEN, 2015).

As células S2 podem ser transfectadas estavelmente utilizando plasmídeos com promotores constitutivos ou indutíveis. O promotor constitutivo tem seu funcionamento ligado ao funcionamento fisiológico normal das células, portanto é regulado por mecanismos de regulação gênica da própria célula. O promotor constitutivo do gene Actina 5C (pAc5), principal gene da *Drosophila melanogaster* que codifica para a actina do citoesqueleto, é o mais utilizado. Já o promotor indutível da metalotioneína (família de proteínas com alta afinidade por íons metálicos), pMt, é o mais indicado para expressão de proteínas de membrana e o mais utilizado para expressão indutível. Esse promotor é induzido pela exposição da célula em meio contendo metais pesados de forma que quando o metal é adicionado em solução, ocorre a atuação dos fatores de transcrição que estimulam o promotor a produzir a metalotioneína e estimulam esse mesmo promotor presente no plasmídeo. Como o gene da rRVGP é transfectado acoplado a esse mesmo

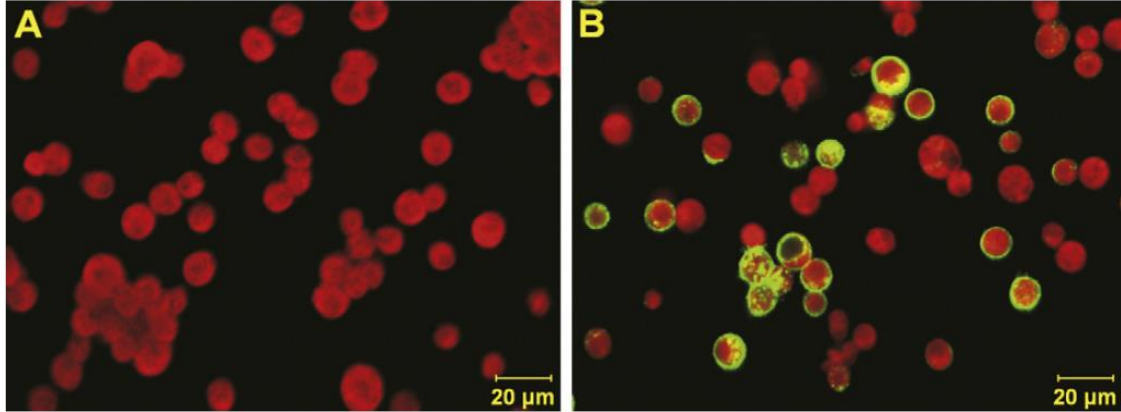
promotor, utiliza-se, portanto, do mesmo sistema para iniciar a produção da metalotioneína e da rRVGP após a exposição das células ao metal pesado. Inúmeras glicoproteínas complexas já foram expressas no sistema de células S2 utilizando esses promotores (ASTRAY *et al.*, 2013; LEMOS *et al.*, 2009; VENTINI *et al.*, 2010, 2014).

Astray *et al.* (2013) estabeleceram populações em que a transcrição do cDNA da RVGP estava sob controle constitutivo (S2AcRVGP-2k, linhagem utilizada nos trabalhos de SWIECH *et al.*, 2008) e populações em que a transfecção da cDNA da RVGP estava sob controle indutível pelo promotor da metalotioneína (S2MtRVGP-Hy, linhagem utilizada nos trabalhos de VENTINI *et al.*, 2010, 2014 e no presente trabalho, com posterior modificação de adição de cauda de histidina.)

Lemos *et al.* (2009) analisaram por microscopia confocal o comportamento das células dessas populações sob controle indutível pelo promotor da metalotioneína, (S2MtRVGP-Hy) e visualizaram que após a indução do promotor com CuSO<sub>4</sub>, realizada com 72 h de cultivo, em 120 h já foi possível visualizar a membrana celular fluorescente na maioria das células S2 recombinantes. Essa análise evidenciou que além de poder ocorrer uma heterogeneidade da expressão de proteína pela população de células, observa-se que ao realizar a indução, ocorre um período para que as células iniciem a expressão da rRVGP, para que posteriormente as proteínas sejam direcionadas para estocagem na membrana celular. Essas duas análises serão importantes para discussões do mecanismo de indução da expressão que estão apresentadas da seção de resultados e discussão do presente trabalho.

A Figura 8 a seguir apresenta a análise realizada por microscopia confocal com as células selvagens e as células recombinantes para marcação da glicoproteína rRVGP na membrana celular.

Figura 8: Análise por microscopia confocal realizada com as células selvagens (A) e recombinantes (B). As células recombinantes foram induzidas com  $\text{CuSO}_4$  em 72 h e com 120 h de cultivo foram coletadas e examinadas para a microscopia confocal, imagem B.



Fonte: Lemos *et al.*, 2009.

A expressão de proteínas recombinantes heterólogas em células S2 apresenta vantagens em relação às células de mamíferos em termos de escalonamento e custo da produção, visto que a maior velocidade de crescimento das células S2 permite um maior rendimento em relação às células de mamíferos, além de apresentar satisfatórios níveis de rendimento proteico (MORAES *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2008; INVITROGEN, 2015).

Além disso, em termos de cultivo de células, são muito mais facilmente cultivadas que células de mamíferos, sendo expandidas na forma semi-aderente em garrafas de cultura e apresentam fácil adaptação ao crescimento nos frascos e reatores na forma de suspensão, sem utilização de microcarregadores. Outras facilidades se referem ao fato de as células crescem facilmente a temperaturas variando de 22°C a 28°C e não requerem incubadora com  $\text{CO}_2$ . Essas características permitem o crescimento celular até altas concentrações, o que viabiliza seu uso em cultivos contínuos e permite o aumento de escala (LEMOS *et al.*, 2009; VENTINI *et al.*, 2010, 2014; SWIECH *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2008).

Essas vantagens estão diretamente relacionadas com o fato das células de inseto cultivadas em suspensão estarem sendo amplamente utilizadas como organismos produtores de vacinas devido sua fácil “escalabilidade”. Esse fator foi demonstrado em estudos de cultivo, os quais as células de insetos foram facilmente cultivadas em suspensão em tanques de 1000 litros para a produção de biopesticidas, tornando o processo de aumento de escala simples e rápido (MOHAMED, 2015).

As células de *Drosophila melanogaster* já produziram diversas proteínas heterólogas, com a expressão proteica apresentando bons níveis de rendimento e adequada atividade biológica. Dentre as proteínas descritas podemos citar: glicoproteína do envelope do vírus da raiva\* (RVGP); antígeno de superfície do vírus da Hepatite B; Eritropoietina Humana (hEPO); proteína citosólica anexina (XIIb); forma truncada da proteína VIP36; proteína verde fluorescente (GFP); interleucina humana 2\* (hIL-2); receptor opióide humana; transferrina humana (hTf); endostatina; proteína gp120 do vírus HIV\* e subunidades de FSH e LH recombinantes\*; \*Expressas pelas células *Drosophila melanogaster* - linhagem S2 (Adaptado de SWIECH *et al.*, 2007; VENTINI *et al.*, 2010).

Provavelmente o produto mais importante que está sendo obtido via sistema de células S2 até o momento é a proteína do envelope do vírus da dengue 80E, que se apresenta como uma das candidatas para a vacina da dengue. O estudo está em fase 2 e os testes já realizados com dois modelos animais, camundongos e macacos, apresentaram elevada imunogenicidade e proteção contra o vírus, mesmo com baixas doses de antígeno em sua formulação. Se os resultados continuarem promissores, a vacina será licenciada e abrirá um campo de trabalho ainda maior com a utilização das células S2 como sistema de expressão de proteínas e formulação de vacinas recombinantes (CLEMENTS *et al.*, 2010).

### 3.5.3 O metabolismo das células de *Drosophila melanogaster* em cultura

O conhecimento do metabolismo da célula em cultura é essencial para a formulação do meio de cultura, para que as estratégias de cultivos sejam bem-sucedidas e principalmente para se obter tanto uma elevada produtividade celular quanto uma adequada atividade biológica da proteína produzida (GÒDIA e CAIRO, 2006).

As células em geral obtêm sua energia de reações de oxidação-redução, sendo que os principais compostos que desempenham papéis fundamentais na fonte de energia, no fornecimento de precursores para síntese de biomassa e para o desenvolvimento das vias biossintéticas são a glicose e a glutamina. Em diversos tipos de inseto foi relatada a característica peculiar do aminoácido prolina em desempenhar função importante como fonte de energia celular (GÒDIA e CAIRO, 2006).

### 3.5.3.1 Metabolismo da prolina

Swiech *et al.* (2008) demonstraram que os principais substratos consumidos durante o crescimento celular em células de *Drosophila melanogaster* S2 em biorreator foram glicose, glutamina e prolina.

Em relação à prolina, diversos estudos analisaram uma variedade de espécies de insetos e sugeriram que os aminoácidos, especialmente a prolina, são utilizados como substrato energético muscular para o voo. Especificamente a prolina, possui a função de transportar unidades de Acetil derivadas de Acetil-CoA encontradas na gordura corporal para o músculo do voo. Assim, essas unidades de Acetil-Coa derivados da gordura corporal, da glicose, ou ainda do metabolismo de aminoácidos, é convertida em  $\alpha$ -cetoglutarato via ciclo do ácido cítrico e posteriormente convertido em prolina, a qual é transportada até o músculo responsável pelo voo. Nessa região muscular, a prolina é reconvertida à  $\alpha$ -cetoglutarato, que entra novamente no ciclo de ácido cítrico para ser oxidada para produzir ATP, a energia necessária para o voo (SCARAFFIA *et al.*, 2003).

Scaraffia *et al.* (2003) demonstraram que quando os insetos utilizam a prolina para esse serviço de transporte das unidades de Acetil, ocorre uma concentração elevada de prolina na hemolinfa dos insetos quando em repouso, que diminui drasticamente durante o voo, com um concomitante aumento da concentração de alanina.

Swiech *et al.* (2007, 2008) demonstraram com células de *Drosophila melanogaster* S2 em experimentos em biorreator a forte dependência na taxa específica de crescimento dessas células em relação a concentração de prolina em solução. Essa dependência foi confirmada no experimento que foi adicionado prolina no cultivo (8.7 mM no meio Sf-900 II), o qual a velocidade específica de crescimento celular quase dobrou em relação ao experimento que não foi adicionado prolina, o que demonstrou, portanto, a razão desse aminoácido ser considerado uma importante fonte de energia para as células S2. Desse modo, os fatores evidenciados por Scaraffia *et al.* (2003) e Swiech *et al.* (2007, 2008) demonstram a importância da prolina no desempenho de parte da via do metabolismo energético das células de *Drosophila melanogaster* S2. O esquema que descreve as vias de atuação de vários aminoácidos, dentre eles a prolina, está descrito no item 3.5.3.4 (Figura 11).

### 3.5.3.2 Metabolismo da glicose e lactato

A membrana citoplasmática é impermeável a algumas moléculas como a glicose, e a entrega desse carboidrato no citoplasma ocorre através de mecanismos de transporte

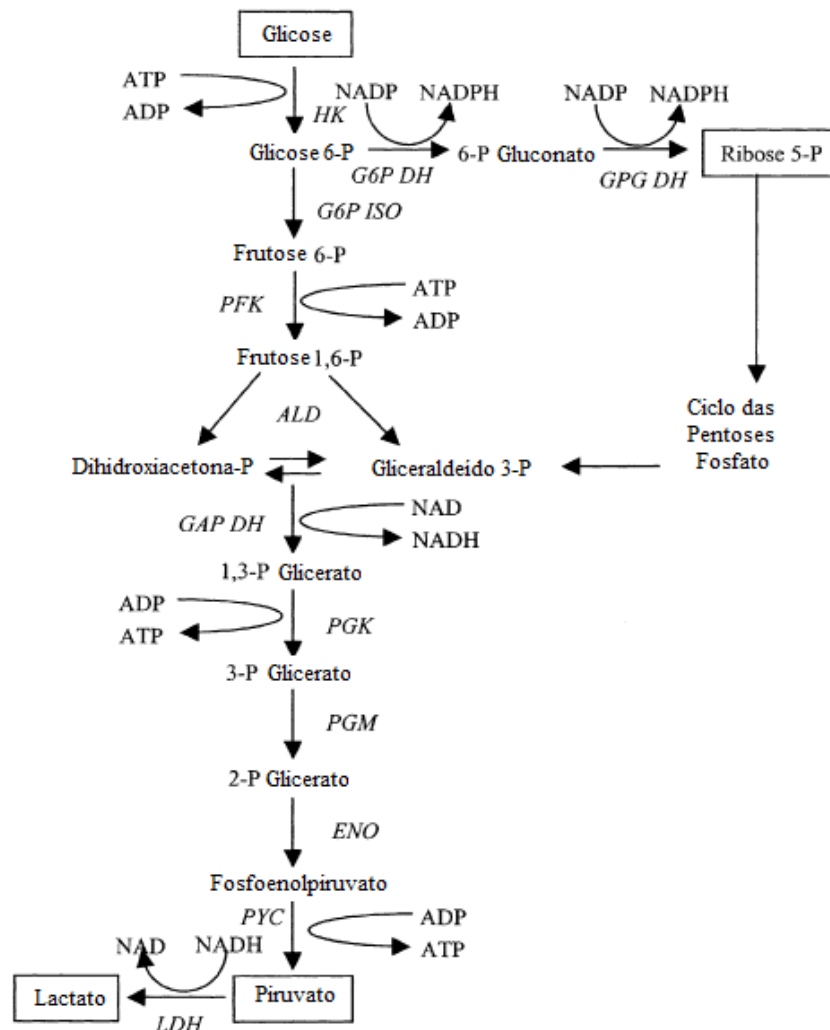
por diferentes moléculas transportadoras. Após esse transporte, uma vez que a glicose esteja incorporada no citosol, ela é convertida em duas principais vias metabólicas: glicólise e o ciclo das pentoses fosfato. Na glicólise, ela é convertida em piruvato gerando intermediários para biossínteses, moléculas NADH e são armazenadas da forma de ligações fosfato de alto nível energético, ATP. Já por meio do ciclo das pentoses fosfato, a glicose-6-fosfato é utilizada para sintetizar glicogênio (reserva energética de glicose), convertido em 6-P-Gluconato gerando a ribose-5-fosfato, importante para síntese de ácidos nucleicos. O ciclo das pentoses fosfato permite a geração de NADPH reduzido em equivalentes requeridos para o anabolismo celular, possibilitando, portanto, a síntese de moléculas complexas a partir de moléculas mais simples (GÓDIA e CAIRO, 2006).

Quando os níveis de glicose são suficientes, o metabolismo segue a via da glicólise e das pentoses fosfatos e forma gliceraldeído-3-fosfato e a disponibilidade de transformar essa molécula em piruvato depende da disponibilidade de NAD oxidado. É necessária uma constante oxidação de NADH em NAD para manter a glicólise, pois o NADH que não foi oxidado é metabolizado pela enzima lactatodesidrogenase (LDH) convertendo o piruvato em ácido láctico. O ácido láctico (lactato) é um dos metabólitos importantes de controle no metabolismo celular em cultura visto que em altos níveis é tóxico para as células, e, portanto, passa a ser prejudicial no cultivo celular (SWIECH *et al.*, 2007, 2008). O estudo do acúmulo de subprodutos do cultivo, como o lactato, é explicado no decorrer do presente estudo, vide item 3.5.3.4.

Análises das taxas metabólicas de consumo de glicose e formação de lactato das células levaram à conclusão que em presença de glicose em concentrações não limitadas, ocorre consumo pela célula em uma taxa muito mais elevada do que seria necessário para manter o crescimento celular. Esse fenômeno tem recebido várias interpretações, mas alguns autores apontam pelo fato de que a geração de lactato a partir do piruvato pode ser utilizado pelas células como maneira de reequilibrar seu potencial redox. Assim, as altas taxas de glicólise gerariam NADH em altas quantidades, que devem ser reduzidas para NAD, a fim de manter essa via funcional (GÓDIA e CAIRO, 2006).

A Figura 9 a seguir apresenta o esquema da visão geral das vias de glicólise e ciclo das pentoses fosfato.

Figura 9: Visão geral das vias de Glicólise e Ciclo das pentoses fosfato.



Fonte: Adaptado de GÒDIA e CAIRO, 2006.

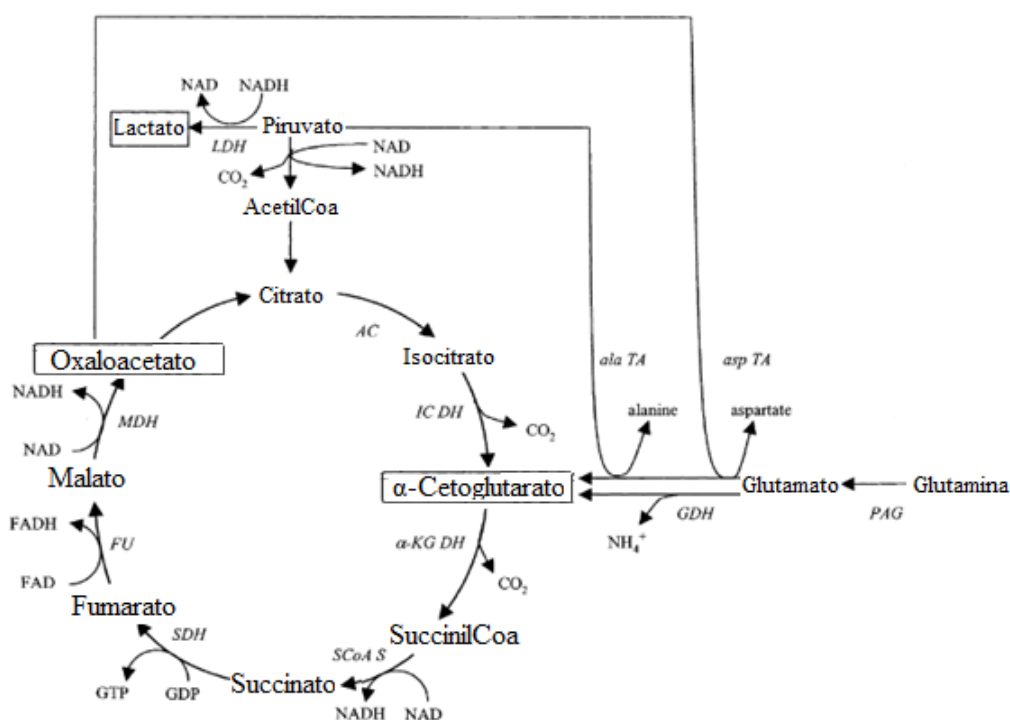
### 3.5.3.3 Metabolismo da glutamina e amônia

Interações importantes dos níveis de flutuação de consumo de glicose e seu metabolismo apresentadas pelas células estão relacionadas ao metabolismo de outros compostos, como os aminoácidos, e em especial, a glutamina. A interação entre as principais vias metabólicas, glicólise e glutaminólise, através do ciclo das pentoses fosfatos, demonstra a flexibilidade do metabolismo da célula de inseto em utilizar diferentes compostos como fonte de energia (SWIECH *et al.*, 2008; GÒDIA e CAIRO, 2006). Essa flexibilidade também está relacionada ao fato da utilização da prolina como fonte energética, evidenciada acima (SCARAFFIA *et al.*, 2003).

A glutamina é o segundo maior componente nos meios de cultura e o fator que revela sua importância como peça chave na fonte de carbono e energia é que seu principal papel é fornecer o intermediário necessário para manter o ciclo das pentoses fosfato em

funcionamento. Esse ciclo corresponde a principal via de metabolismo central, tendo dois papéis fundamentais: fornecer compostos precursores para o anabolismo celular (citado acima) e gerar a maior parte da energia metabólica. Essa geração de energia é feita à nível do  $\alpha$ -cetogluturato, em que a glutamina é precursora para isso (GÒDIA e CAIRO, 2006). A Figura 10 evidencia a visão geral da principal via metabólica da glutamina.

Figura 10: Visão geral da principal via metabólica da glutamina.



Fonte: Adaptado de GÒDIA e CAIRO, 2006.

Na sequência dos experimentos de Swiech *et al.* (2007) com células de *Drosophila melanogaster* S2 em biorreator (referido acima), foi demonstrado em um segundo experimento que adicionando juntamente prolina e glutamina ocorreu o favorecimento do crescimento em termos de máxima concentração de células, mas não na velocidade específica de crescimento. Isso pode se dever ao fato de que as concentrações desses nutrientes foram mantidas a níveis similares devido ao fato do experimento ter sido realizado no modo batelada alimentada.

Swiech *et al.* (2007) evidenciaram nas curvas de crescimento dos quatro experimentos desenvolvidos que quando a concentração de glutamina ficou abaixo de 2mM, ocorreu uma significativa redução na taxa de crescimento. Além disso,



similarmente ao que ocorre em células de mamíferos, após o esgotamento de glutamina o crescimento de células viáveis cessou e a densidade celular iniciou seu declínio, o que demonstra a importância desse aminoácido no metabolismo das células S2.

Como resultado do metabolismo da glutamina, a maior parte de sua degradação culmina na geração de íons amônio no cultivo celular e o restante é incorporado para dentro da célula por meio de diferentes sistemas de transporte de aminoácidos, que não são específicos para a glutamina e que medeiam o movimento de outros aminoácidos (GÒDIA e CAIRO, 2006). O estudo do acúmulo de subprodutos do cultivo, como o acúmulo de amônia, é explicado a seguir.

#### 3.5.3.4 Efeitos do acúmulo de subprodutos do cultivo e atuação de outros aminoácidos

Como evidenciados acima, juntamente com as elevadas taxas de consumo de glicose e glutamina, ocorre a acumulação de lactato e íons amônio, respectivamente, nos meios de cultura. Durante o cultivo celular, se as concentrações de glicose e glutamina atingirem rapidamente valores limitantes devido às elevadas taxas de consumo, os efeitos do lactato juntamente com o acúmulo de íons amônio podem em conjunto gerar prejuízo ao cultivo celular. Esse prejuízo pode estar relacionado aos efeitos naturais desses compostos ou indiretamente, através do aumento da osmolaridade média. Como padrão geral do cultivo de células animais, está bem estabelecido que os efeitos inibidores diretos do amônio são muito mais significantes do que os de efeitos de lactato (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Em relação às células em cultivo, a liberação de lactato no meio está relacionada com a alteração do pH do cultivo celular. Para evitar efeitos negativos diretos relacionados a acidificação do meio devido a geração de lactato, o controle do pH dos cultivos celulares deve ser monitorado. Em um sistema com controle de pH, os efeitos da concentração de lactato no crescimento das células são claramente observados para concentrações somente superiores à 40 mM (3,6 g/L). No entanto, o controle da acumulação de lactato se faz necessário principalmente em sistemas de cultura em batelada, em que o prolongamento do tempo de cultivo é acompanhado pelo consumo de glicose e geração de lactato, que por ser um sistema em batelada pode alcançar níveis elevados mais rapidamente (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Em relação à influência do lactato na formação do produto, efeitos de inibição têm sido relatados para concentrações acima de 20 mM (1,8 g/L), mas observações com base

na produção específica revelou um aumento da magnitude do efeito do lactato (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Swiech *et al.* (2007, 2008) observaram que no cultivo em biorreator com células de *Drosophila melanogaster* S2 a produção de lactato foi significativamente baixa, atingindo concentrações máximas de 0,057 g/L, mesmo após a privação de oxigênio. Esse valor é muito inferior aos valores relatados relacionados à inibição do crescimento celular ou relacionados à inibição do produto (SWIECH *et al.*, 2008).

Como resultado do metabolismo da glutamina, a maior parte de sua degradação culmina na geração de íons amônio no cultivo celular (GÒDIA e CAIRO, 2006). Swiech *et al.* (2007) demonstraram que alguns aminoácidos, especialmente alanina, asparagina e glutamato, foram consumidos apenas depois da exaustão de glutamina e prolina, possivelmente como novas fontes de energia. A degradação desses outros aminoácidos devido à exaustão da glutamina também está relacionada com o acúmulo de alta quantidade de amônia no cultivo.

Nas células em geral, os efeitos sobre o metabolismo de amônio são observados a partir de níveis muito mais baixos, cerca de 2-4 mM, valores facilmente alcançados em cultivos celulares em batelada. No entanto, curiosamente experimentos com células de mamíferos (CHO e hibridoma) demonstraram que elas podem ser adaptadas para crescer em concentrações elevadas de amônia (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Em relação às células de inseto, estudos de BORASH *et al.*, 2000 têm demonstrado que *Drosophila melanogaster* pode desenvolver uma elevada tolerância genética a altos níveis de compostos tóxicos, como amônia e uréia. Swiech *et al.* (2007) demonstraram em seu experimento em biorreator que a quantidade de amônia atingiu o nível de 62 mM, sendo que essa concentração de amônia não havia sido relatada em cultura de células animais até o momento, indicando que as células de *Drosophila melanogaster* S2 são resistentes a altos níveis de amônia.

No entanto, em relação à produtividade da proteína influenciada pelos níveis de amônia, existem estudos na literatura relatando um declínio na produtividade específica, outros autores observaram um aumento da produtividade e outros ainda não observaram nenhuma influência. Devido a esse fato, o que está sendo analisado em termos de qualidade do produto produzido é o padrão da glicosilação obtido no produto final (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Butler (2005) e Palomares *et al.* (2004) têm demonstrado que os níveis de íons amônio possuem um significativo efeito na distribuição das estruturas de glicanos

encontradas na proteína recombinante produzida, conhecido como micro-heteroneidade. Embora esse mecanismo não tenha sido completamente elucidado, é evidente que esse efeito pode influenciar nos padrões de glicosilação da glicoproteína. Portanto, na tentativa de produzir um biofármaco que necessita de glicosilação de forma eficiente, o monitoramento dos níveis de amônia no processo torna-se fator importante de análise durante o cultivo (BUTLER, 2005; PALOMARES *et al.*, 2004).

Descritas as características do metabolismo da glicose e da glutamina, com produção de lactato e íons amônio, notamos que é evidente que a interação entre elas dependerá das concentrações relativas disponíveis, bem como da não limitação de outros nutrientes no cultivo, como exemplo outros aminoácidos (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Para a glicose em uma concentração acima da concentração não limitante, a assimilação dela pela célula será maior conforme sua maior concentração, antes que o consumo máximo de saturação seja atingido. O aumento no consumo específico é acompanhado então pelo aumento do rendimento lactato/glicose, com valores em torno de 1 ou 2 mols lactato para 1 mol de glicose, podendo ser ainda maiores devido a contribuição de lactato produzido a partir de glutamina e um menor consumo de oxigênio devido ao baixo metabolismo oxidativo. Por outro lado, quando os níveis de glicose são limitantes e a glutamina está presente em concentração não limitante, o metabolismo celular se adapta à diminuição de energia e de biossíntese, através do aumento da taxa de consumo da glutamina, com um aumento conjunto da excreção de amônia e do consumo de oxigênio. O entendimento desses mecanismos se faz muito importante visto o fato de nos cultivos em batelada e batelada alimentada, as células ficarem expostas a diferentes concentrações de glicose e glutamina conforme o passar do tempo de cultivo (GÒDIA e CAIRO, 2006).

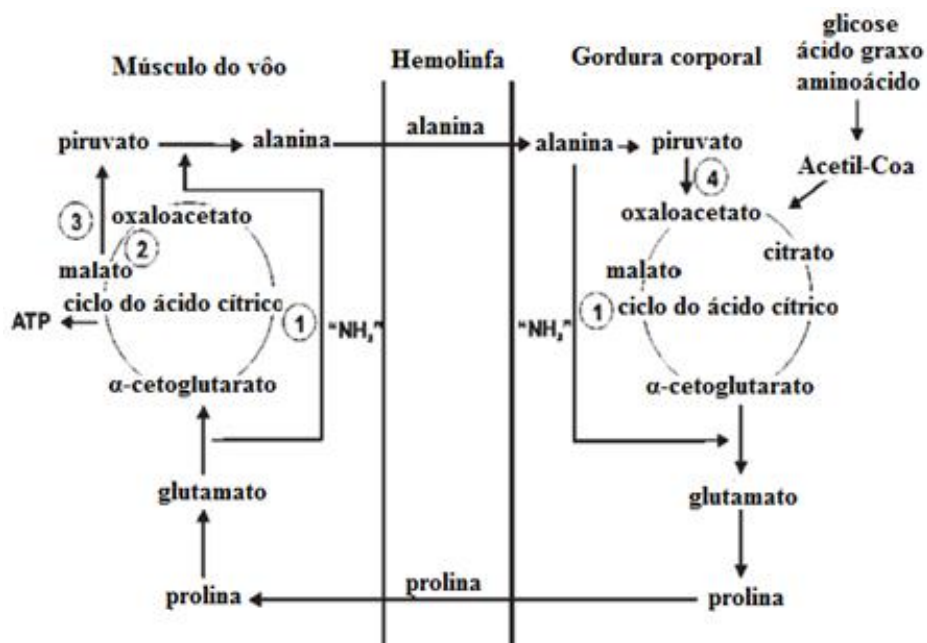
Uma interessante evidência frequentemente relatada nos cultivos com células S2 se deve a produção de alanina em quantidades elevadas, que é frequentemente observada em meios de cultura que possuem concentração elevada de glicose (BHATIA *et al.*, 1997), como é o caso dos meios Sf-900 II e III, que possuem concentração de 10 g/L de glicose. Outro fator relevante relatado por Scaraffia *et al.* (2003) onde foi demonstrado que quando os níveis de prolina estão disponíveis, o metabolismo do inseto a utiliza para o transporte das unidades de Acetil. Inicialmente há uma concentração elevada de prolina na hemolinfa dos insetos, que diminui drasticamente durante a sua utilização, concomitantemente com o aumento da concentração de alanina em solução (SCARAFFIA *et al.*, 2003). Swiech *et al.* (2008) evidenciaram que a alanina foi

produzida em quantidades consideráveis em todas os experimentos desenvolvidos em biorreator com o meio Sf-900 II, atingindo acúmulo máximo de 47 mM, nos ensaios suplementados com 8.7 mM de prolina.

Além dos fatores citados, diversos autores têm relatado a elevada produção de alanina pelas células de inseto como um importante mecanismo de estratégia para evitar que a acumulação de amônia em solução alcance níveis tóxicos (CARRONDO *et al.*, 2002). Esse mecanismo é nomeado por Bathia *et al.* (1997) como “mecanismo de produção de alanina para atuação como pia de amônia”. Portanto, utilizar a amônia para o metabolismo de produção de alanina seria uma estratégia de defesa da célula para evitar a toxicidade, visto que a alanina não causa efeitos tóxicos no cultivo celular e ainda pode ser convertida para gerar energia pelo ciclo das pentoses fosfato (CARRONDO *et al.*, 2002; SCARAFFIA *et al.*, 2003).

A Figura 11 ilustra as possíveis rotas metabólicas dos três mecanismos explicados acima: mecanismo da glicose gerando alanina através do piruvato; mecanismo da prolina gerando alanina e mecanismo da amônia convertida em alanina.

Figura 11: Via metabólica dos insetos envolvendo os aminoácidos prolina e alanina.



Fonte: Adaptado de Scaraffia *et al.*, 2003.

### 3.5.3.5 A estabilidade da glicoproteína

Células eucarióticas superiores como as células de inseto não conseguem sintetizar uma série de aminoácidos essenciais ao metabolismo e muitos deles são obtidos

através do meio de cultura (GÒDIA e CAIRO, 2006). Aminoácidos como aspartato, asparagina, glutamato, glutamina e serina são muito utilizados pelas células de inseto pois são requeridos na incorporação de proteínas celulares e outras estruturas (BATHIA *et al.*, 1997). Swiech *et al.* (2007, 2008) demonstraram que apesar das concentrações elevadas de aminoácidos no meio Sf-900 II, alguns deles foram esgotados prematuramente durante os cultivos dos experimentos em biorreator com *Drosophila melanogaster* S2, são eles: glutamina, prolina, cisteína e serina. Como evidenciado acima, a prolina e glutamina são utilizados como fonte de energia e a maior parte da serina e cisteína foi consumida para a síntese proteica.

Os aminoácidos serina e cisteína estão diretamente relacionados com estabilização e estrutura de dobragem da glicoproteína produzida. A serina participa intensivamente no processamento de proteínas através da glicosilação, pois sua cadeia lateral ajuda no correto dobramento e proteção da biomolécula produzida contra degradação. Já o aminoácido cisteína é reconhecido pela formação das pontes de sulfeto, que desempenha papel crucial na estabilização de proteínas. Por esses motivos, Swiech *et al.* (2008) afirmaram que na intenção de alcançar uma produtividade ótima de rRVGP estável, existe a necessidade do meio Sf-900 II ser suplementado com estes dois aminoácidos, juntamente com glutamina. Essa conclusão foi possível após Swiech *et al.* (2008) demonstrarem uma queda acentuada na concentração rRVGP após cerca de 5 dias de cultura, fato possivelmente explicado pela redução acentuada da concentração de glutamina, serina e cisteína no cultivo celular de células S2 em biorreator.

O entendimento das relações metabólicas e de estabilidade proteica por parte dos aminoácidos são questões relevantes para o desenvolvimento do bioprocessamento de forma adequada, em que apontamos essa relevância vinculada principalmente à duas razões: esgotamento de aminoácido pode prejudicar o crescimento celular e, portanto, atrapalhar o desenvolvimento do bioprocessamento e a instabilidade da proteína produzida pode culminar em perda de estrutura, que culmina em perda de função. Essas razões motivaram a parte inicial dos experimentos preliminares que visou analisar a composição do meio de cultura Sf-900 III, para verificar necessidade de suplementação, como foi demonstrado por Swiech *et al.* (2007) com o meio Sf-900 II.

#### 3.5.3.6 Metabolismo de oxigênio

Os constituintes de fase gasosa mais importantes nos cultivos de células animais são oxigênio e dióxido de carbono. O monitoramento desses gases no cultivo celular é

essencial para o bom desenvolvimento do processo (MORAES *et al.*, 2008). Em relação ao metabolismo celular, o oxigênio é um importante componente visto que é o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, que está diretamente relacionado à geração de energia na forma de ATP, molécula fundamental pelo funcionamento de toda maquinaria celular (GÒDIA e CAIRO, 2006). Portanto, ele deve ser considerado como um nutriente celular semelhante aos descritos anteriormente (glicose e aminoácidos), pois seu fornecimento é fator chave que limita a concentração de células viáveis nos sistemas de cultivo (MORAES *et al.*, 2008).

Devido sua baixa solubilidade em meio aquoso, (MORAES *et al.*, 2008) cerca de 7 mg/L para células animais nos meios convencionais (GÒDIA e CAIRO, 2006), o oxigênio é frequentemente o primeiro nutriente a se tornar limitante em altas densidades celulares (MORAES *et al.*, 2008). Como os níveis de oxigênio estão diretamente relacionados à atividade da cadeia transportadora, quando baixos e em conjunta acumulação intracelular de NADH, forçam a célula para obter energia a partir do metabolismo anaeróbico, que contribui para formação de lactato. No entanto, nessa situação a geração de ATP é baixa e uma aguda mudança é observada com respeito ao uso de ATP para manutenção celular, sendo 50% mais baixa para o crescimento limitado em oxigênio quando comparada a níveis de 60% de saturação (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Em culturas estáticas, um volume vazio cerca de dez vezes maior que o volume do meio é necessário para o fornecimento adequado de oxigênio. Em culturas agitadas, a transferência de O<sub>2</sub> é dependente da taxa de agitação e da geometria do impelidor. O seu fornecimento aos cultivos celulares deve ser feito de maneira suave e pode ser realizado pelos seguintes métodos: aeração superficial, borbulhamento de gás, difusão por membranas, aumento da pressão parcial de O<sub>2</sub> e aumento da pressão do biorreator (MORAES *et al.*, 2008).

O borbulhamento é um método simples e eficiente, porém pode causar graves danos celulares devido à formação de bolhas. O método das membranas evita esse fator, porém é um método de elevado custo e, portanto, de difícil ampliação de escala. O aumento da pressão parcial de O<sub>2</sub> e a pressurização do reator são boas opções para aumentarmos a solubilidade do oxigênio e sua taxa de difusão, mas devem ser empregados em estágio avançados do cultivo, em que a concentração celular está elevada, visto que oxigênio em elevadas concentrações pode culminar em efeitos de toxicidade. Uma boa opção para o suprimento de oxigênio, utilizada no presente trabalho, se baseia no fato da difusão do oxigênio ser realizada pelo movimento induzido das ondas do

biorreator *Wave*, em que podemos elevar a pressão parcial do O<sub>2</sub> na entrada do reator e o difundir-lo pelo movimento das ondas (MORAES *et al.*, 2008; GE HEALTHCARE).

Swiech *et al.* (2007, 2008) realizaram experimentos em situações de hipóxia, baixa concentração de oxigênio, com células de *Drosophila melanogaster* S2 e demonstraram que uma longa fase estacionária foi observada e que as células em condições de hipóxia foram capazes de sobreviver durante 15 horas, sem aparente danos, demonstrando capacidade de recuperação de sua atividade metabólica anterior. Huhtala *et al.* (2005) estudando os efeitos de estresse no crescimento e na produção da proteína em células do inseto Sf-9 realizaram um estudo semelhante. Após um período de 15 horas de privação de oxigênio, a viabilidade celular reduziu para 80% e as células iniciaram alterações em sua morfologia. A fase estacionária prolongada pode ser explicada pelo fato de *Drosophila melanogaster* S2 apresentar uma notável resistência à hipóxia, que é a condição predominante nessa fase do cultivo. Apesar do mecanismo de susceptibilidade, tolerância e privação de oxigênio não estarem completamente elucidados, recentemente foi demonstrado que embriões de *Drosophila melanogaster* possuem mecanismos naturais de proteção ao estresse causado por situações de hipóxia. Dessa forma, é esperada a tolerância a privação de oxigênio na fase estacionária (SWIECH *et al.*, 2008). Essa resistência das células *Drosophila melanogaster* S2 demonstra uma fácil adaptação à hipóxia, o que contribui para que esse sistema seja promissor na produção de proteínas recombinantes devido a essa importante versatilidade metabólica (SWIECH *et al.*, 2008).

Do mesmo modo, também se evidencia a versatilidade metabólica no aumento dos valores de saturação de ar no biorreator. Ventini *et al.* (2010, 2014) em seu experimento biorreator *Bioflo* 110 com células S2MtRVGP-H-His operaram com 10% de saturação de ar enquanto Swiech *et al.* (2008) operaram no biorreator *Bioflo* 110 com a linhagem S2AcRVGP2K mantendo saturação de ar próxima de 50%. Wang *et al.* (2012) utilizando células de *Drosophila melanogaster* S2 em biorreator *Wave* para produção de anticorpos monoclonais operaram com saturação de ar de 40%. Esses dados enfatizam a robustez celular do sistema de expressão em questão tanto em cultivo com concentrações de oxigênio mais baixas quanto em cultivo com concentrações mais elevadas.

### 3.5.3.7 Visão global do metabolismo para fins de monitoramento de experimentos

Para propiciar uma visão global do metabolismo, a Tabela 8 foi construída evidenciando as funções e informações relevantes dos principais nutrientes e metabólitos relacionados ao metabolismo das células S2.

**Tabela 8: Principais nutrientes e metabólitos do metabolismo das células S2.**

<b>Nutriente/ Metabólito</b>	<b>Função</b>	<b>Informação relevante</b>	<b>Fonte</b>
Glicose	Molécula chave das principais vias metabólicas energéticas.	Principal componente do meio de cultura. É essencial ao crescimento celular e ao anabolismo celular.	GÒDIA e CAIRO, 2006
Glutamina	Mantém o Ciclo das pentose fosfato em funcionamento, que é a principal via do metabolismo energético central.	Abaixo de 2mM: redução do $\mu_{\text{máx}}$ , seu esgotamento pode iniciar do declínio da densidade celular.	SWIECH <i>et al.</i> , 2007, 2008
Lactato	Produto do metabolismo da glicose, que em excesso pode ser tóxico e inibitório.	Inibição celular ocorre acima de 40 mM e a inibição do produto recombinante ocorre acima de 20 mM.	GÒDIA e CAIRO, 2006
Amônia	Produto do metabolismo da glutamina e de outros aminoácidos.	As células são resistentes à elevadas concentrações, porém esses níveis podem influenciar no padrão de glicosilação.	BUTLER., 2005.; PALOMARES <i>et al.</i> , 2004 ;
Prolina	Importante no metabolismo energético.	Aumenta a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ )	SCARAFFIA <i>et al.</i> , 2003 e SWIECH <i>et al.</i> , 2007
Alanina	Produto obtido como resultado do cultivo celular que está envolvido nas rotas metabólicas da glicose, prolina e amônia.	Produzido em altas concentrações no cultivo celular, porém não é tóxico ao cultivo.	CARRONDO <i>et al.</i> ; 2002; SCARAFFIA <i>et al.</i> , 2003 ; SWIECH <i>et al.</i> , 2007.
Oxigênio	Está diretamente relacionado à geração de ATP	É frequentemente o primeiro nutriente a se tornar limitante em altas densidades celulares	MORAES <i>et al.</i> , 2008

### 3.5.3.8 Meios de cultura para células de inseto

O meio de cultura utilizado para o cultivo de células animais deve fornecer de maneira balanceada aminoácidos, carboidratos, sais, lipídeos, vitaminas, dentre outros nutrientes para suprir as necessidades nutricionais da célula (FRESHNEY *et al.*, 2010;



MOHAMED, 2015). Os meios de cultura propostos para produção de biofármacos devem suportar além do crescimento da célula até elevadas concentrações, a manutenção da alta produção de proteínas recombinantes (GÓDIA e CAIRO, 2006).

As estratégias iniciais para o sucesso do cultivo de células de inseto baseados na reprodutibilidade de condições *in vivo* para condições *in vitro* baseou-se no desenvolvimento de um meio de cultura que se assemelhava a composição da hemolinfa. Após a caracterização dos componentes da hemolinfa, o meio foi obtido seguindo suas condições de pH, entre 6,2 e 6,5 e de osmolaridade, entre 300 e 380 mOsm. Os primeiros meios de cultura foram suplementados com 10% de hemolinfa e depois com 10% de soro fetal bovino. Os meios mais populares utilizados por muito tempo foram o Grace's Medium e o TnM-FM (MOHAMED, 2015).

Os meios de cultura para insetos são complexos, contendo a maioria dos aminoácidos (alguns meios possuem todos), lipídios, colesterol, hormônios, vitaminas, traços de elementos e suplementos não definidos. Glicose é a fonte de carbono mais utilizada, embora as células de inseto possam consumir frutose e maltose como fontes alternativas. Todos os meios contêm Pluronic F-68, que é um agente que protege as células contra tensões de cisalhamento e a utilização de soro fetal bovino passou a ser evitada nos cultivos e desde 1990 os meios de cultura isentos de soro começaram a ser intensamente comercializados (MOHAMED, 2015).

Os principais tipos de meios desenvolvidos para células de inseto, isentos de soro fetal bovino são: baculoGROW®, Oxford Expression Technologies; CCM3®, HyClone; EX-CELL®405, Sigma-Aldrich; EX-CELL®420, Sigma-Aldrich; Express Five®, Life Technologies; Insect-XPRESS®, Lonza; IS BAC®, Irvine Scientific; PSFM®, Protein Sciences Corporation; PSFM-J1®, Wako Pure Chemical Industries; Sf-900®II, Life Technologies; Sf-900®III, Life Technologies; SFM4Insect®, HyClone; SFX-Insect®, HyClone e TiterHigh Sf Insect®, Sigma-Aldrich (MOHAMED, 2015)

O meio utilizado no presente trabalho é o meio Sf-900® III - SFM Life Technologies®, EUA. Esse meio não contém componentes de origem animal, o que minimiza a oportunidade de agentes adventícios e facilita a aprovação do produto durante o processo regulatório, quando comparados com meios que utilizam componentes de origem animal, ou ainda, soro fetal bovino. Ele possui uma quantidade elevada de glicose, 10 g/L, porém a formulação do meio de cultura não é fornecida pelo fabricante.

### 3.6 Cultivo de células de *Drosophila melanogaster* no *Wave Bioreactor (Single-use System)*

O aumento na demanda por processos de produção dos biofármacos nos últimos anos têm pressionado os pesquisadores e as indústrias farmacêuticas a desenvolverem processos de produção em larga escala cada vez mais eficientes. Desse modo, a busca por equipamentos mais sofisticados com novas tecnologias baseadas em operações rápidas e simples, com redução do custo e recurso disponível apresentam propostas muito promissoras (FRIES *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012).

Na Tabela 9 estão listados alguns processos industriais realizados para a produção de vacinas, anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes, nas quais dependendo da demanda e custo, são produzidos em escala maior ou menor (KRETZMER, G., 2002).

**Tabela 9: Processos industriais realizados em larga escala para produção de vacinas, anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes.**

Linhagem Celular	Escala (L)	Biorreator	Produto
BHK-21	10.000	Tanque agitado	Vacina da febre aftosa
CHO	10.000	Tanque agitado	tPA
Células Vero	1.000	Tanque agitado	Vacina Pólio
Hibridoma murino	1.000	Tanque agitado	Anticorpos monoclonais
BHK	500	Tanque agitado perfusão	Fator VIII
Hibridoma murino	2.000	Air-lift	Anticorpos monoclonais

Fonte: KRETZMER, G., 2002.

Desse modo, com a necessidade de desenvolver processos de produção em larga escala cada vez mais eficientes, a análise de custo e viabilidade do processo como um todo se faz necessária. Com essa análise, fica evidente que as etapas de preparação, limpeza e esterilidade do reator são de grande importância e demandam grande parte do tempo do processo. Nesse cenário surgem os “Biorreatores descartáveis com movimento induzido de onda” (*Single-use Wave Bioreactor* – GE® Healthcare Life Sciences), que se

apresentam como uma promissora alternativa. Por oferecerem dispositivos descartáveis, proporcionam uma variedade de vantagens como: redução do tempo de preparação; eliminação de fases de limpeza e esterilização e facilidade na utilização. Esse conjunto de vantagens contribui para uma redução significativa no custo e capital investido no processo (FRIES *et al.*, 2005; GE HEALTHCARE; WANG *et al.*, 2012).

O Biorreator *Wave* é composto pela plataforma que induz o movimento, o módulo de controle e a *Cellbag*. A *Cellbag* trata-se do compartimento descartável empregado para o cultivo, que é colocada sobre a plataforma. É fabricada com material biocompatível e inerte (Polietileno de baixa densidade/Etileno Vinil Acetato), previamente esterilizada por radiação gama e possui aprovação pela FDA (FRIES *et al.*, 2005; GE HEALTHCARE).

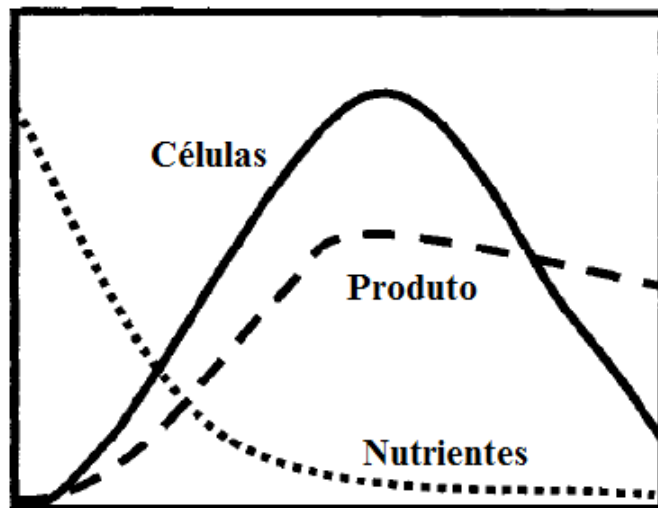
O biorreator *Wave* permite o controle da temperatura através de um sensor acoplado a um dispositivo de aquecimento localizado na plataforma de agitação. Conforme a informação do sensor, controla-se a temperatura através do sistema de aquecimento da plataforma, a qual está em contato direto com a *CellBag*. O biorreator permite o controle do movimento e da angulação da plataforma e a escolha do modo de operação, inclusive o modo perfusão. Pode-se também monitorar o pH através de um sensor óptico acoplado à *CellBag*, que através da utilização de CO<sub>2</sub> ou da adição de ácido e base, permite o controle adequado do pH do cultivo.

Como evidenciado acima, o biorreator *Wave* é uma boa opção para suprimento de oxigênio, pois a agitação da plataforma juntamente com a elevada relação entre área superficial e volume de operação possibilita boa transferência de oxigênio sem prejudicar a célula por questões de cisalhamento, como ocorre com borbulhamento de ar, por exemplo. Além disso, o movimento induzido de ondas permite a homogeneidade de nutrientes e metabólitos, assim como a manutenção das células em suspensão (MORAES *et al.*, 2008; GE HEALTHCARE). O monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido no biorreator *Wave* é realizado através de um sensor óptico integrado ao sistema, que pode ser calibrado de acordo com as condições desejadas.

Os biorreatores podem ser operados em diferentes regimes, dentre os quais podemos citar: batelada, batelada alimentada, contínuo e perfusão. Nesse trabalho será realizado o modo de operação em batelada, devido ao fato de ser o modo de operação mais simples e de menor custo de utilização e fabricação (FENGE e LULLAU, 2006).

O modo de operação em batelada é realizado com um volume inicial de meio de cultura e células, sem nenhuma outra adição ou retirada durante o processo, de modo que o conteúdo do reator é colhido integralmente uma única vez ao final do processo. As células crescem exponencialmente, enquanto os nutrientes são consumidos e os produtos residuais metabólicos são acumulados até a densidade celular máxima, de modo que essa densidade é obtida de acordo com o alcance da limitação de nutrientes e inibição dos metabólitos do cultivo. O esquema que ilustra o comportamento da cinética no modo de operação em batelada é ilustrado abaixo na Figura 12 (FENGE e LULLAU, 2006).

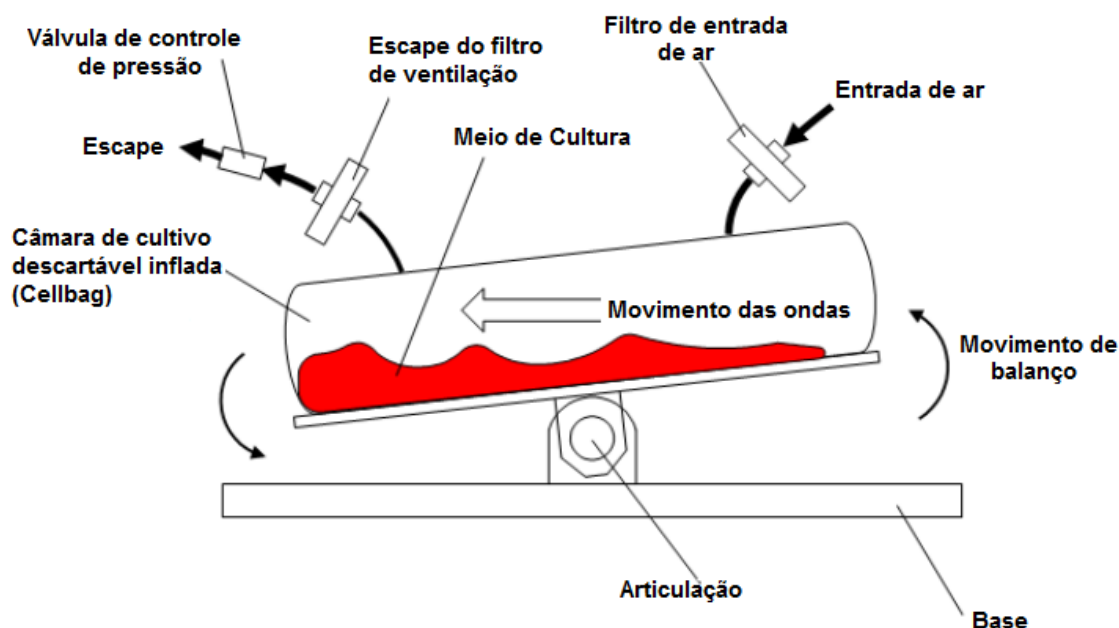
Figura 12: Cinética do crescimento celular, o consumo de nutrientes e formação de produto no modo batelada.



Fonte: FENGE e LULLAU, 2006.

A Figura 13 a seguir apresenta o esquema de funcionamento do biorreator com agitação induzida por ondas (Biorreator *Wave*<sup>TM</sup> – Sistema 2/10) descrito acima, equipamento esse utilizado no presente trabalho.

Figura 13: Esquema de funcionamento do Biorreator *Wave*<sup>TM</sup> – Sistema 2/10.



Fonte: Adaptado do manual de operação do equipamento, GE® Healthcare Life Sciences.

A Figura 14 apresenta a imagem do equipamento *Wave*<sup>TM</sup> – Sistema 2/10 e seu módulo de controle.

Figura 14: Biorreator *Wave*<sup>TM</sup> – Sistema 2/10. Plataforma de operação e *Cellbag*<sup>TM</sup> (A); módulo de controle *Wavepod*<sup>TM</sup> II *Integrated Controller* (B).



Fonte: GE® Healthcare Life Sciences – ReadToProcess<sup>TM</sup>.

Os biorreatores *Wave* foram introduzidos em 1990 e desde então existem vários modelos do equipamento sendo utilizados nas etapas pré-clínicas, clínicas e aumento de

escala de produtos biotecnológicos. Além das vantagens de limpeza e esterilização citadas acima, os biorreatores foram altamente credenciados por especialistas da área e tiveram eficácia comprovada na produção de proteínas recombinantes em algumas linhagens de insetos (Sf9, Sf21 e S2) e mamíferos (CHO, PER). Além disso, são especialmente adequados para a cultura de células em suspensão e compatível com o sistema estável de células S2 transfectadas, como é o caso do presente trabalho (WANG *et al.*, 2012).

Alguns estudos demonstram a capacidade promissora de produção de proteínas recombinantes pelo biorreator *Wave*. Wang *et al.* (2012) demonstraram a produção de anticorpo monoclonal em regime de batelada com a utilização de células S2 transformadas, alcançando 201 mg de produção total e em regime de perfusão alcançou um valor superior à 8 gramas totais de anticorpo monoclonal. Fries *et al.* (2005) demonstraram a produção de interleucina recombinante em regime de batelada com utilização de células S2 transformadas alcançando 498 mg de produção total.

Devido às razões evidenciadas acima, ao baixo número de dados na literatura (ressaltando que são poucos dados, porém demonstrando resultados promissores) e o fato do Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares da UFSCar já dominar essa tecnologia, foi escolhido o biorreator *Wave* para produção em larga escala da glicoproteína do vírus da raiva do presente trabalho.

### 3.7 Comentários Gerais

Fazendo uma análise genérica do que foi apresentado e discutido neste capítulo de Revisão Bibliográfica podem-se selecionar alguns aspectos que merecem especial atenção e que são abordados a seguir.

Nos últimos 20 anos a genética molecular tem evoluído muito refletindo-se numa ampla gama de aplicações biotecnológicas de grande relevância na produção de biofármacos através de diferentes tipos de células, merecendo menção especial as células de inseto, especificamente as células de *Drosophila melanogaster* S2. Estas células, relativamente novas no cenário das aplicações biotecnológicas, têm demonstrado resultados promissores como sistema de expressão de proteínas heterólogas e como agentes de transformação interessante para bioprocessos em larga escala. Por outro lado, o desenvolvimento de processos de cultivo em biorreator também tem passado por grandes avanços, contando com contribuições de equipamentos inovadores que permitem um melhor aproveitamento das características favoráveis das células de inseto S2.

A apresentação do estado da arte da produção de rRVGP pela linhagem S2MtRVGP-H-His com um limitado número de referências bibliográficas pode ser justificada pelo fato de que os trabalhos encontrados na literatura científica foram publicados por membros do grupo multidisciplinar que vem lidando no Brasil com essa tecnologia ao longo dos últimos 10 anos (MORAES *et al.*, 2012).

O conceito com apenas 20 anos de vida do biorreator de agitação induzida por ondas (*Waves*) vem mostrando na prática virtudes muito interessantes que se complementam bem com as demandas tecnológicas do cultivo de células S2 em escala ampliada. Somando a isso as vantagens econômicas que este novo biorreator oferece, não é um exagero pensar que o biorreator clássico de tanque agitado utilizado atualmente para aumento de escala de produtos biotecnológicos nas etapas pré-clínicas e clínicas deverá ser superado a curto prazo. Assim, a avaliação desse biorreator para produção de rRVGP com a linhagem S2MtRVGP-H-His neste trabalho parece oportuna e importante, não só pelo fato de conhecer uma nova alternativa de produção em larga escala, mas também pela possibilidade singular de utilização de um lote de rRVGP purificada em testes de imunogenicidade.

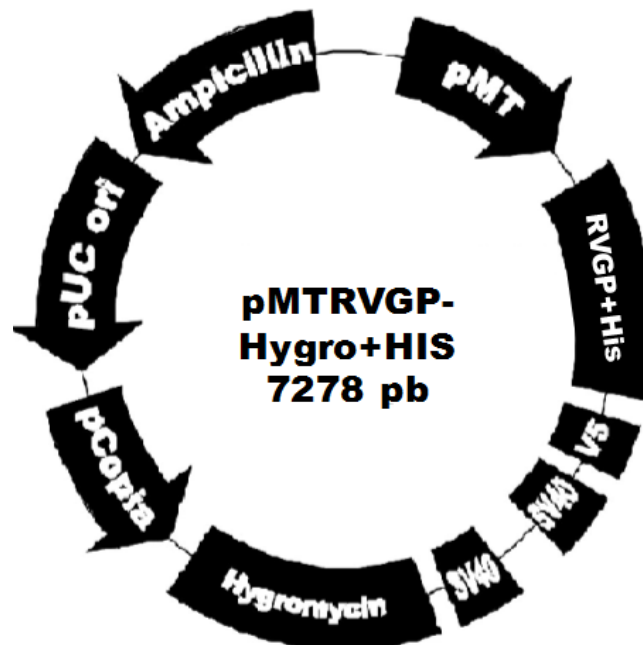
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagem celular S2MtRVGP-H-HIS

As células de *Drosophila melanogaster* S2 da linhagem S2MtRVGP-H-His foram obtidas no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan (VENTINI *et al.*, 2014). A Figura 15 ilustra o mapa do vetor de expressão respectivo e o nome da linhagem recombinante evidencia seus principais aspectos, dentre os quais:

- a) S2: nome da célula desenvolvida por Schneider;
- b) Mt: promotor do gene da metalotioneína em drosófilas (pMT);
- c) RVGP: abreviatura do inglês *Rabies Virus Glycoprotein – Pasteur strain* (Glicoproteína do vírus da raiva – cepa Pasteur)
- d) H: gene da resistência à higromicina;
- e) His: cauda de histidina (6 histidinas sequenciais), utilizado para etapas de purificação da glicoproteína.

Figura 15: Mapa do vetor de expressão da célula S2MtRVGP-H-His.



Fonte: Adaptado de LEMOS *et al.*, 2009.

O plasmídeo foi construído com o promotor da proteína pertencente à família das metalotioneínas, pMt, que é o mesmo promotor encontrado no genoma da *Drosophila*



*melanogaster* S2. Na Figura 15 pode-se observar o pMt e o cDNA da RVGP (RVGP+His) com a cauda de histidina. Quando o cobre é adicionado em solução, ocorre a liberação dos fatores de transcrição que estimulam o promotor a expressar a metalotioneína. Assim, da mesma forma o pMt acaba estimulando a expressão da rRVGP com a cauda de histidina. Portanto com esse vetor utiliza-se do mesmo sistema para produzir a metalotioneína e a rRVGP dessa linhagem recombinante (ASTRAY *et al.*, 2013; LEMOS *et al.*, 2009).

Além disso, outros componentes foram utilizados para a montagem do vetor de clonagem, como o SV40, que corresponde à sequência de poli-adenilação do vírus SV40; a “ampicilin” correspondente ao gene que confere resistência a ampicilina; pUc ori, que corresponde a origem de replicação de DNA em bactérias e o V5, que se refere ao epítipo de detecção da proteína V5 do kit Invitrogen (LEMOS *et al.*, 2009).

#### **4.2 O meio de cultura Sf-900® III**

O meio de cultura utilizado nos trabalhos foi o Sf-900 III (Life Technologies, EUA). Trata-se de um meio comercial cuja composição química é desconhecida que foi utilizado puro, livre de soro fetal bovino e sem adição de qualquer outro reagente ou suplemento. A composição de aminoácidos, quantificações de glicose, lactato e amônia do meio puro foram realizadas e estão descritos na seção de métodos analíticos (item 4.4).

#### **4.3 Procedimentos seguidos nos experimentos de cultivo de células**

A seguir se descrevem os procedimentos que foram seguidos para o preparo do banco de células de trabalho e realização dos experimentos de cultivo de células.

##### **4.3.1 Banco de células**

As células foram obtidas em março de 2014 e foram transportadas ao Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC/DEQ/UFSCar) para formação do banco de células de trabalho. A organização do banco de células de trabalho realizado nessa época foi suficiente para realizar todos os experimentos da presente dissertação de mestrado a partir de uma fonte comum.

O lote de células inicial foi trazido do Instituto Butantan. As células foram inicialmente cultivadas em frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> tratados para adesão (Corning, EUA) até alcançar concentração celular próxima de  $5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> e foram retiradas do cultivo no meio da fase de crescimento exponencial. Após centrifugação à 2400 rpm por

5 minutos, tiveram o sobrenadante descartado e foram ressuspensas em solução de congelamento (50% soro fetal bovino, 40% de meio de cultivo Sf-900® III e 10% DMSO). Os criotubos foram preparados com volume final de 1 mL e concentração celular de  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. Inicialmente as células foram mantidas em ultrafreezer a -80°C em um recipiente com isopropanol para o gradual decréscimo da temperatura e após 24 h foram transferidas para o container (vaso Dewar) contendo nitrogênio líquido à -196°C.

#### 4.3.2 Descongelamento de células

Para o descongelamento das células o criotubo foi retirado do nitrogênio líquido e colocado em banho termostático à 37°C para rápido descongelamento da suspensão. Quando descongelada, a suspensão foi colocada em um tubo Falcon com 10 mL de meio de cultura e centrifugada em 2400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo a solução DMSO (tóxica para a célula em temperatura ambiente) foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura fresco e colocadas em um frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> tratados para adesão (Corning, EUA). As células foram mantidas numa incubadora na temperatura controlada de 28°C por, no mínimo, 3 dias. Após a ativação, procurou-se estimular o crescimento até atingir número suficiente para preparo do inóculo a ser utilizado nos cultivos em frascos Schott.

#### 4.3.3 Seleção da linhagem recombinante com antibiótico higromicina

A linhagem recombinante S2MtRVGP-H-His contém o gene de resistência a higromicina que possibilita sua seleção para os experimentos de cultivo de células. Para seleção da população recombinante foi utilizado o antibiótico Higromicina B (*Hygromycin B - Gibco®*) numa concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>, adicionada numa proporção de 60 µL de solução de antibiótico por cada 5 mL de meio de cultura.

Para propiciar a seleção de apenas células recombinantes resistentes ao antibiótico, visto que algumas células selvagens, ou ainda, células formadas incorretamente devido a possíveis defeitos de replicação pudessem estar presentes com as células recombinantes, foram realizadas passagens sucessivas para acompanhamento da viabilidade da célula S2 após o descongelamento visando sua utilização como inóculo. Com esse estudo foi possível a determinação da quantidade adequada de passagens necessárias para seleção satisfatória da linhagem recombinante. Como na segunda passagem da população mista de células (recombinantes e não recombinantes) na presença do antibiótico, a viabilidade apresentada foi de 11,05% e na terceira passagem

a viabilidade foi próxima de zero, foi padronizado três passagens pós-congelamento com 60 µL de higromicina por cada 5 mL de meio de cultura em frasco T de 25cm<sup>2</sup> (Corning, EUA). Esse procedimento de seleção e preparação das células recombinantes para iniciar cada experimento de cultivo levou 13 dias.

#### 4.3.4 Cultivo em frasco Schott

Inicialmente as células foram cultivadas em frascos Schott para estudos de pequena escala e posteriormente para realização do pré-inóculo do biorreator. Frascos Schott de volume de 100 mL foram preparados com inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> e meio de cultura completando o volume de trabalho de 20 mL. Os frascos foram mantidos em incubador rotatório (Superohm, BRA) com agitação de 100 rpm e controle de temperatura de acordo com o experimento que estava sendo realizado (22, 25 ou 28°C). Para indução da expressão da glicoproteína rRVGP no frasco Schott, a adição da solução de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mM foi realizada diretamente no líquido dentro do Schott. Embora a concentração de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tenha sido sempre a mesma em todos os cultivos, os momentos de indução variaram de acordo com os experimentos propostos, baseando-se na densidade celular do cultivo, normalmente  $3-5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.3.5 Amostragem

Imediatamente após a retirada da amostra, o pH desta foi aferido (Seven Compact-Mettler Toledo, UK) e a contagem de células bem como a análise da viabilidade celular foram realizadas. O restante da amostra foi centrifugado e dividido em duas partes, a biomassa centrifugada compactada, que foi alíquotada para quantificar a glicoproteína rRVGP através do teste de ELISA e o líquido sobrenadante, que foi utilizado para análises de concentração de aminoácidos, glicose, lactato e amônia. O tratamento da amostra foi realizado da mesma forma para os experimentos em pequena e larga escala e tinham a mesma finalidade. Em relação às quantidades, nos estudos de pequena escala retirou-se 2 mL para o tratamento citado, com alíquotas de 100 µL para contagem. Já nos estudos em larga escala foi retirado em média 3,5 mL do biorreator *Wave*, com alíquotas de 100 µL para contagem.

Os procedimentos de retirada de amostra para análise da concentração de rRVGP e contagem de células foram realizados a cada 24 h. O procedimento de análise do sobrenadante foi realizada à cada 48 h em pequena escala e à cada 24 h em larga escala, devido à grande disponibilidade de volume do biorreator em relação ao frasco Schott e

devido a necessidade de maior disponibilidade de dados cinéticos dos experimentos realizados em biorreator.

#### 4.4 Métodos analíticos

##### 4.4.1 Densidade celular e viabilidade

Para análise da viabilidade e densidade celular foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan (0,4% posteriormente diluído em uma proporção de 1:10) através de contagem em hematocitômetro. Foram contados 16 quadrantes de 1 mm<sup>2</sup> cada (10-250 células por quadrante), na forma de dois eventos isolados: uma diluição inicial (160 µL PBS, 20 µL tripan, 20µL de suspensão celular) e realizada contagem de 8 quadrantes e uma segunda diluição partindo da amostra inicial, com nova contagem de 8 quadrantes. Essa medida em dois eventos foi realizada para reduzir os efeitos de erro de contagem e/ou pipetagem, bem como evitar que as células ficassem muito tempo expostas a ação do tripan.

Quatro quadrantes de 10<sup>-4</sup> mL foram definidos como um evento de contagem e sua concentração calculada. A média e o desvio padrão das concentrações foram obtidos com os valores de quatro desses eventos (16 quadrantes no total). Sendo que o valor da concentração era obtido pela seguinte fórmula:

$$C_x = (N \times D)/V \quad \text{cel.mL}^{-1} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

N= média dos 4 eventos de contagem

D= diluição utilizada do tripan (10)

V= volume do quadrante (10<sup>-4</sup>)

##### 4.4.2 Quantificação de glicose e lactato

As quantificações de glicose e lactato foram realizadas no analisador enzimático *YSI Biochemical Analyser 7100 MBS*, após centrifugação da amostra em 2400 rpm por 5 minutos para retirada de células e debris, coletando apenas o sobrenadante.

##### 4.4.3 Quantificação de amônia

A análise de amônia foi realizada com um eletrodo de íon seletivo (ORION- 710A – Thermo Scientific, EUA). Para aplicar o método foi preparada uma curva de calibração

com uma solução padrão de amônia e realizada diluição da amostra em agitação seguindo a proporção: 1 mL de amostra; 19,6 mL de água ultrapura tipo 1; 400 µL de uma solução que atua como ajustador de força iônica, denominada Solução ISA (ajustador de força iônica- Hexis Científica, BRA).

#### 4.4.4 Quantificação de aminoácidos em cultivo

As análises de aminoácidos foram executadas por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), seguindo a metodologia proposta por Heinrikson e Meredith, 1984.

O método cromatográfico utilizou fase estacionária constituída pela coluna pico-tag (Waters, IRL), fases móveis A: água ultrapura tipo 1, acetonitrila (Panreac, ESP) trietilamina (Sigma, GER) e acetato de sódio tri-hidratado (Synth, BRA) e fase móvel B: água ultrapura tipo 1 e acetonitrila (Panreac, ESP). Na pré-coluna de derivatização o PITC (Waters, IRL), conhecido como reagente de Edman, foi adicionado para realizar a degradação dos aminoácidos sequencialmente em aminas primárias e secundárias em 254 nm à temperatura ambiente. Para quantificação dos aminoácidos foi utilizado o padrão de aminoácidos Waters e também foram preparadas manualmente curvas de calibração dos aminoácidos prolina (Sigma, GER), arginina (Sigma, GER), asparagina (Sigma, GER) e glutamina (Sigma, GER).

Para preparação das amostras, foi realizada centrifugação em 2400 rpm por 5 minutos para retirada de células e debris e alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram reservadas para continuar com a análise. A preparação das amostras incluíram etapas sequenciais de: filtração; secagem em temperatura ambiente; hidratação das amostras (solução preparada a partir de etanol, água ultrapura tipo 1 e trietilamina); secagem em temperatura ambiente; derivatização das amostras (solução preparada a partir de água ultrapura tipo 1, trietilamina e PITC); secagem em temperatura ambiente; adição da solução diluente adequada para análise de aminoácidos livres, Pico-Tag Sample Diluent to Amino Acid analysis (Waters, IRL), e injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Waters, IRL).

#### 4.5 Quantificação da rRVGP produzida

A quantificação da rRVGP produzida foi feita através do método ELISA, (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) que é o imunoensaio mais utilizado para a detecção de antígenos ou anticorpos (VAZ *et al.*, 2007). A técnica baseou-se na imobilização do anticorpo em fase sólida e na utilização de um anticorpo conjugado, com preservação da atividade imunológica e enzimática. Ao final do imunoensaio, o substrato formou um produto colorido e através de um espectrofotômetro obteve-se a relação entre a intensidade da cor e a quantidade do antígeno que estava sendo analisado na amostra.

As amostras obtidas nos experimentos de cultivo foram aliqüotadas em  $10^6$  células, centrifugadas à 3000 rpm por 3 minutos para descarte do sobrenadante e armazenadas em pellet seco à  $-20^{\circ}\text{C}$ . A quantificação da rRVGP presente na membrana das células foi realizada pelo teste de ELISA com uma metodologia anteriormente padronizada pelo LIV do Instituto Butantan (ASTRAY *et al.*, 2008).

Inicialmente as amostras foram descongeladas e ressuspensas com tampão de solubilização e como a rRVGP é uma proteína transmembranar, as amostras foram posteriormente tratadas com um tampão de lise com detergente (Igepal 0,2%) para que ocorresse o rompimento da membrana celular e a proteína permanecesse na micela do detergente. As amostras foram incubadas com o tampão de lise por 1 h na geladeira com agitações periódicas e posteriormente centrifugada à 10.000 rpm por 10 minutos.

Após o tratamento das amostras para propiciar a liberação da rRVGP da membrana celular, elas foram adicionadas à placa de 96 poços previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal específico para o sítio III antigênico da rRVGP em sua conformação trimérica (IgG-D1), diluído em tampão carbonato e mantido por 12 horas durante a noite anterior. Após a adição das amostras à placa, o conjunto foi incubado por 1 hora à  $37^{\circ}\text{C}$  e posteriormente submetido à lavagem por cinco vezes com tampão de lavagem (pH 7,2).

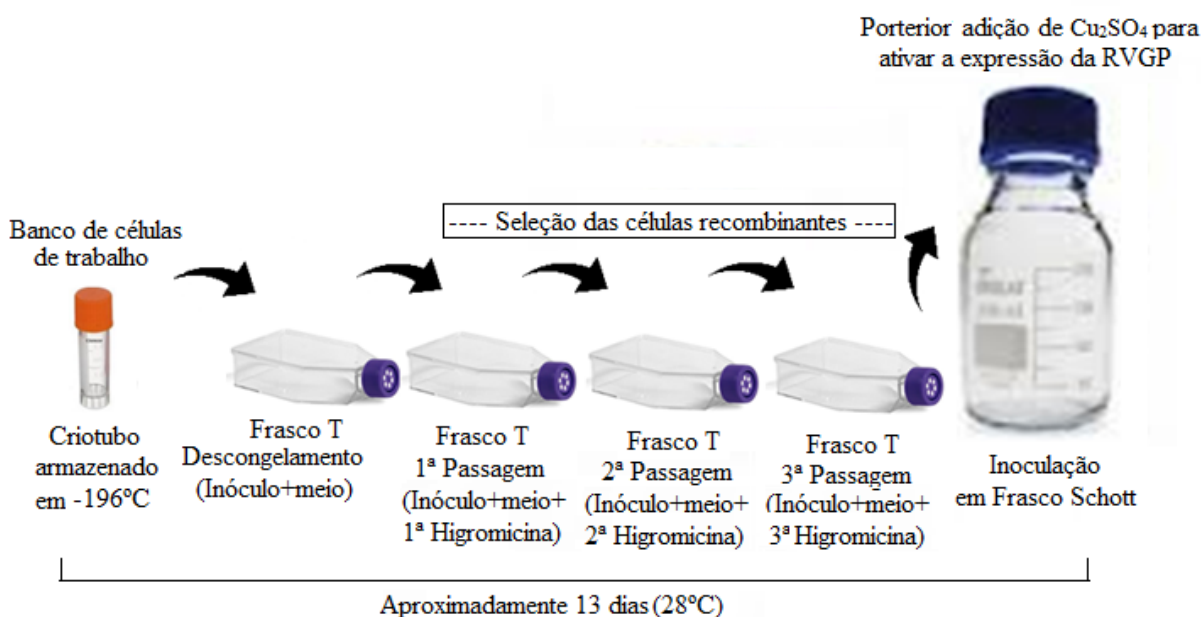
Após esse procedimento, foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-glicoproteína conjugado com peroxidase (IgG-D1-Po) e a placa foi incubada por 1 hora à  $37^{\circ}\text{C}$ . Os poços foram novamente lavados por seis vezes com tampão de lavagem e o substrato cromógeno (tampão citrato+ortophenylene diamine, 2mg/mL) foi adicionado, sendo a placa mantida no escuro por 30 minutos. Foi adicionado tampão de parada (ácido sulfúrico 4 N) que depois de reagir provocou uma cor alaranjada da solução. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 492nm no leitor de microplacas (Multiskan MJ, Labsystems Helsinki, FIN).

Para utilizar os valores de absorvância para obtenção da concentração da proteína na amostra foi padronizada uma curva de referência. Essa curva de referência foi obtida utilizando-se o antígeno de referência, vírus rábico linhagem *Pasteur* inativado, purificado e contendo 10  $\mu\text{g}$  de RVGP, incubado com as amostras e controles negativos durante o ensaio. Ao final, a comparação entre os valores da curva de referência e os valores de absorvância lidos permitiram os cálculos para a obtenção da concentração de rRVGP em cada amostra, realizada em duplicata.

#### 4.6 Experimentos em frasco Schott para estudo da cinética de crescimento e expressão de rRVGP da célula S2MtRVGP-H-His em cultura

O procedimento padronizado para o cultivo de células S2MtRVGP-H-His para expressão da rRVGP em pequena escala seguiu as etapas descritas na Figura 16.

Figura 16: Esquema ilustrativo do procedimento padronizado para cultivo das células em pequena escala.



Nota: Imagens ilustrativas.

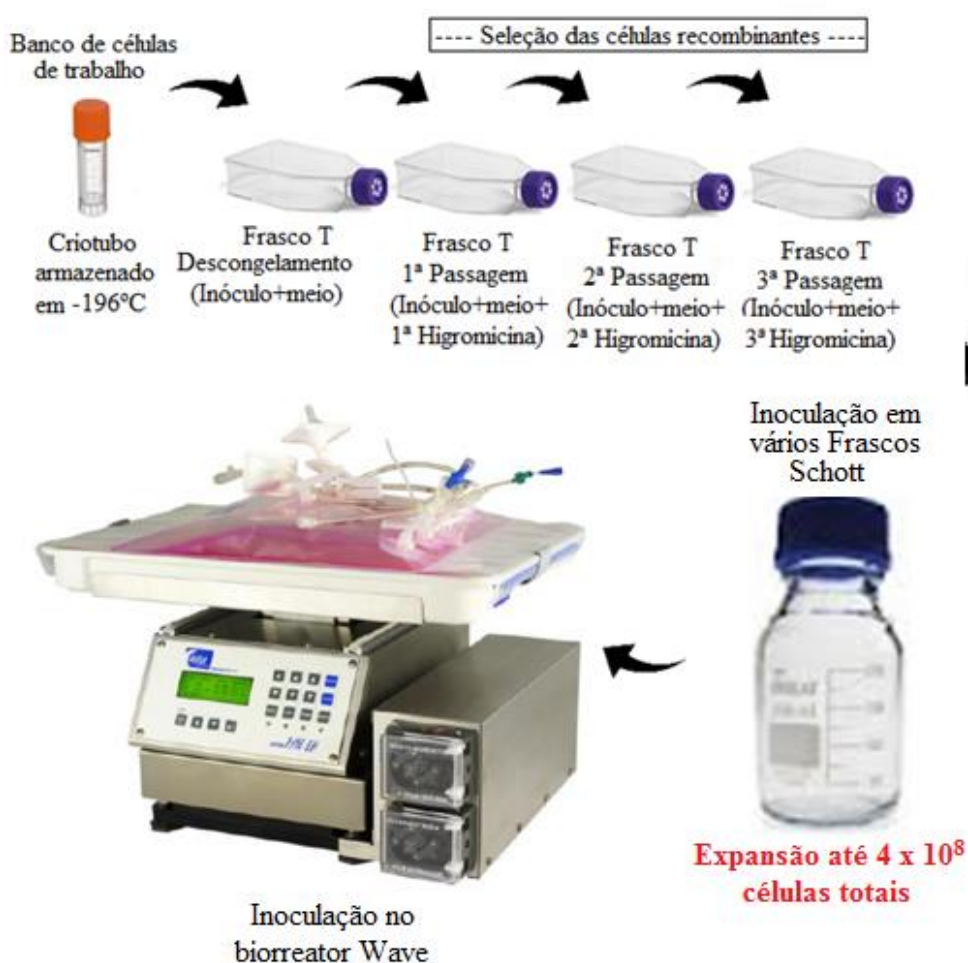
Todas as manipulações de linhagens celulares nestes experimentos foram realizadas em Câmara de Biossegurança Classe II e os protocolos desenvolvidos seguiram todas as normas de manipulação de organismos geneticamente modificados.

#### 4.7 Experimento em biorreator *Wave* para produção de rRVGP em larga escala

Seguindo o protocolo descrito em pequena escala, a quantidade de células foi expandida em frascos Schott até alcançar  $4 \times 10^8$  células viáveis totais que foram inoculadas no biorreator *Wave* com 650 mL de meio de cultura, para alcançar a concentração do inóculo mínimo que a célula S2 depende para expandir, correspondente à  $5 \times 10^5 \text{ cel. mL}^{-1}$ . O biorreator iniciou seu funcionamento nas seguintes condições: temperatura de 28°C; saturação de ar próxima de 65%; pH 6,2; agitação 20 rpm e ângulo de 8°.

O esquema do procedimento padronizado para o cultivo de células para expressão da rRGVP em larga escala seguiu as etapas evidenciadas na Figura 17.

Figura 17: Esquema ilustrativo do procedimento padronizado para cultivo das células em larga escala.



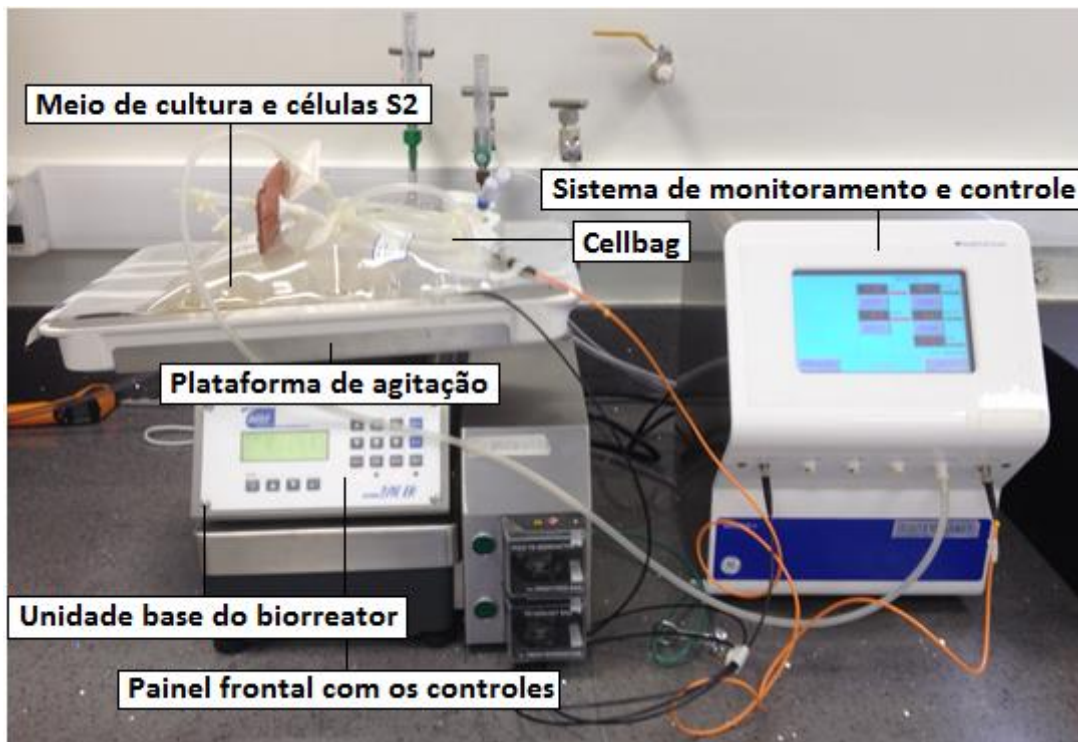
Nota: Imagens ilustrativas.



A totalidade de células produzidas ao final dos experimentos em larga escala foi recuperada da *Cellbag* pelos dispositivos de coleta da mesma, lavadas em solução PBS, ressuspensas em solução de congelamento (25 mM TrisHCL, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> dissolvido em 80% de água ultrapura tipo 1 e 20% de glicerol, com pH final da solução de 7,2) e encaminhadas ao Instituto Butantan para análise de ELISA, Western Blotting, ensaios de purificação e caracterização da proteína produzida.

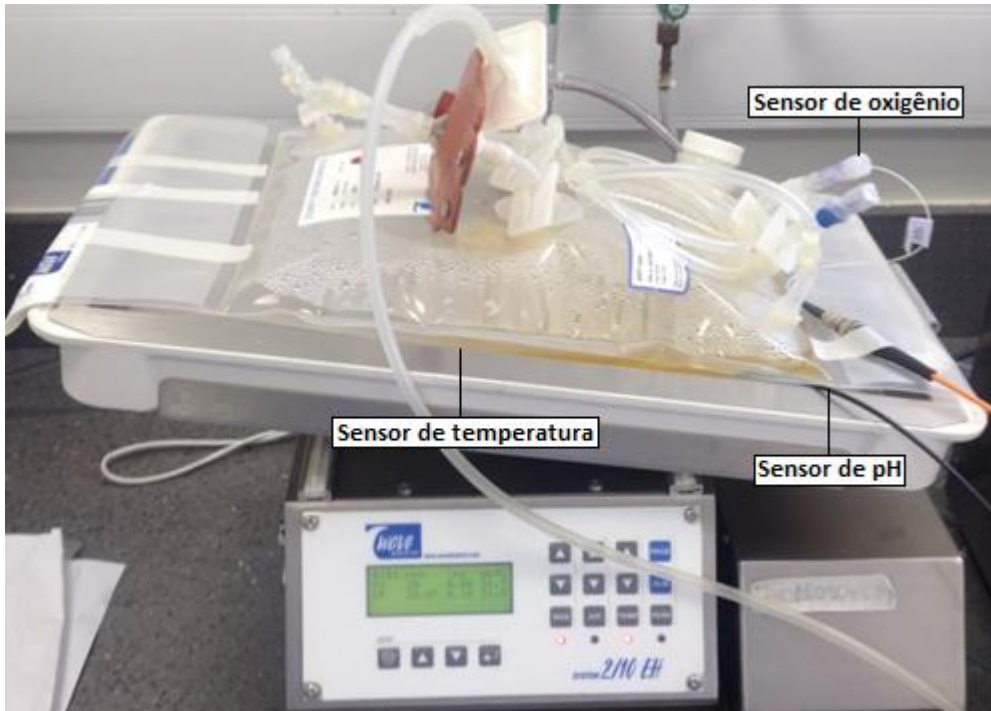
As Figuras 18 e 19 mostram o Biorreator *Wave* – Sistema 2/10 em funcionamento no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC/DEQ/UFSCar) durante o cultivo das células S2MtRVGP-H-His. A Figura 18 apresenta a plataforma de operação, a *Cellbag* e o módulo de controle *Wavepod II Integrated Controller* e a Figura 19 mostra a *Cellbag* e vários componentes.

Figura 18: Biorreator *Wave* – modelo 2/10 em funcionamento em um experimento de cultivo.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 19: *Cellbag* do cultivo de células S2MtRVGP-H-His com os sensores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura acoplados ao sistema.



Fonte: Acervo pessoal.

Todas as manipulações de linhagens celulares nestes experimentos foram realizadas em Câmara de Biossegurança Classe II e os protocolos desenvolvidos seguiram todas as normas de manipulação de organismos geneticamente modificados.

#### 4.8 Metodologias de cálculos

A velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ) apresentada pela Equação 2, fornece a velocidade de aumento do número de células no cultivo para determinado incremento de tempo. O valor de  $\mu$  é constante e máximo ( $\mu_{\text{máx}}$ ) na fase de crescimento exponencial e calcula-se por regressão linear na fase exponencial no gráfico do logaritmo neperiano do número de células em função do tempo, representado pela Equação 3.

$$\mu = \frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N} \quad [\text{h}^{-1}] \quad \text{Equação 2}$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} = \frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N} \quad \text{Portanto} \quad \mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln(N/N_0)}{t} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$\mu$  = velocidade específica de crescimento;  $N$  = número de células no instante  $t$ ;  $N_0$  = número de células no tempo 0.

Os resultados de  $\mu_{m\acute{a}x}$  foram apresentados com o desvio padrão e o valor do  $R^2$  da regressão linear realizada para cada caso.

A produção específica de rRVGP foi calculada a partir da Equação 4.

$$\textit{Produção específica} = \frac{E}{X} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

$E$  = quantidade de rRVGP obtida no presente cultivo em ng/mL;

$X$  = número de células média na fase de crescimento com indução com  $\text{CUSO}_4$

A produção total do cultivo foi obtida a partir da seguinte equação:

$$\textit{Produção total do cultivo} = E \times V \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

$E$  = quantidade de rRVGP obtida neste cultivo em ng/mL;

$V$  = volume total do cultivo

Os métodos estatísticos realizados para as comparações de resultados experimentais foram determinados por meio do Teste-t paramétrico e um valor de  $p$  inferior à 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

#### 4.9 Descrição dos experimentos realizados nesta pesquisa

Todos os experimentos realizados durante a presente dissertação de mestrado estão descritos na Tabela 10 a seguir:

**Tabela 10: Resumo de todos os experimentos realizados neste trabalho**

<b>Experimento</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>frasco Schott/ Biorreator</b>	frasco Schott						Wave 2/10	Wave 2/10
<b>Volume de trabalho (mL)</b>	20						650	650
<b>Temperatura (°C)</b>	28	25	22	28	28	28	28	28
<b>Agitação</b>	100 rpm						20 rpm/ 8° até 96h; 21 rpm/ 9° até 120h	20 rpm/ 8° até 96h; 21 rpm/ 9° até 120h
<b>Monitoramento de concentração de oxigênio dissolvido</b>	Não houve						Saturação de ar inicial próxima de 80%. Oscilação em queda durante o cultivo	Saturação de ar inicial próxima de 80%. Oscilação em queda durante o cultivo
<b>Indução da expressão da rRVGP (h)</b>	72	72	72	Zero	24	48	72	72
<b>Finalidade do experimento</b>	Estudos da melhor temperatura de cultivo para expressão da rRVGP			Estudo do melhor momento de indução da expressão de rRVGP			Estudos de aumento de escala	

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo em pequena escala das principais características cinéticas e fisiológicas das células S2MtRVGP-H-His.

O estudo em pequena escala envolveu diversos experimentos em frascos Schott de acordo com a metodologia padronizada descrita no item 4.3.4 e foram divididos em quatro diferentes categorias apresentadas a seguir.

#### 5.1.1 Análise da composição do meio de cultura para verificar necessidade de suplementação.

Por serem novas no campo das aplicações biotecnológicas as células de inseto S2 não dispõem de um meio de cultura específico otimizado para crescimento e expressão de proteínas recombinantes. O meio comercial Sf-900 II, desenvolvido para a linhagem de célula de inseto *Spodoptera frugiperda* ou Sf9 tem sido objeto de estudo para expressão de diversas proteínas recombinantes e, por extensão, para testes com a célula S2 de *Drosophila melanogaster*. Swiech *et al.* (2007) demonstraram que o meio Sf-900 II pode ser utilizado para o cultivo eficiente de células S2, porém, com suplementação de alguns aminoácidos. A suplementação dos aminoácidos cisteína, serina e prolina propiciou o aumento do crescimento celular. Uma terceira versão do meio de cultura Sf900, o Sf900-III, lançada recentemente no mercado parece ter levado em consideração a necessidade de um meio ainda mais equilibrado para as células de *Spodoptera frugiperda* e, possivelmente, para as células de *Drosophila melanogaster* S2. Portanto, a comparação entre as composições dos meios Sf-900 II e Sf-900 III tornou-se necessária para verificar a viabilidade de uso do meio Sf-900 III neste trabalho.

Inicialmente foi realizada uma análise da composição de aminoácidos, glicose e lactato do meio puro. Na Tabela 11 é apresentada a composição dos meios Sf-900 III e Sf-900 II para fins de comparação.

**Tabela 11: Resultado da análise do meio de cultura Sf-900 II feita por Swiech *et al.* (2007) e Sf-900 III neste trabalho.**

Aminoácido	Sf-900 II (mg.L <sup>-1</sup> )	Sf-900 III (mg.L <sup>-1</sup> )	Resultado da comparação
<b>Aspartato</b>	n.d.	827,6	n.d.
<b>Glutamato</b>	n.d.	1007,6	n.d.
<b>Asparagina</b>	1100,0	1332,1	Aumentou 21%
<b>Serina</b>	310,0	313,4	Semelhante
<b>Glutamina</b>	2300,0	1194,6	Reduziu 52%
<b>Glicina</b>	570,0	242,9	Reduziu 135%
<b>Histidina</b>	220,0	239,2	Semelhante
<b>Arginina</b>	330,0	795,4	Aumentou 140%
<b>Treonina</b>	350,0	252,9	Reduziu 38%
<b>Alanina</b>	360,0	84,8	Reduziu 324%
<b>Prolina</b>	600,0	607,3	Semelhante
<b>Tirosina</b>	230,0	265,9	Aumentou 16%
<b>Valina</b>	620,0	650,2	Semelhante
<b>Metionina</b>	1000,0	1093,6	Semelhante
<b>Cisteína</b>	45,0	72,5	Aumentou 61%
<b>Isoleucina</b>	760,0	866,0	Aumentou 14%
<b>Leucina</b>	360,0	366,8	Semelhante
<b>Fenilalanina</b>	870,0	1126,0	Aumentou 29%
<b>Lisina</b>	640,0	482,4	Reduziu 32%
<b>Triptofano</b>	n.d.	66,3	n.d.
<b>Glicose</b>	10,0	9,42	Semelhante
<b>Lactato</b>	0,014	0,012	Semelhante

Notas: Todos os valores estão em mg/L, exceto glicose e lactato que estão em g/L. n.d.: não disponível na referência. Os resultados de análise dos aminoácidos por Swiech *et al.* (2007) e do presente trabalho foram realizados pela mesma metodologia HPLC, com o mesmo protocolo e no mesmo cromatógrafo.

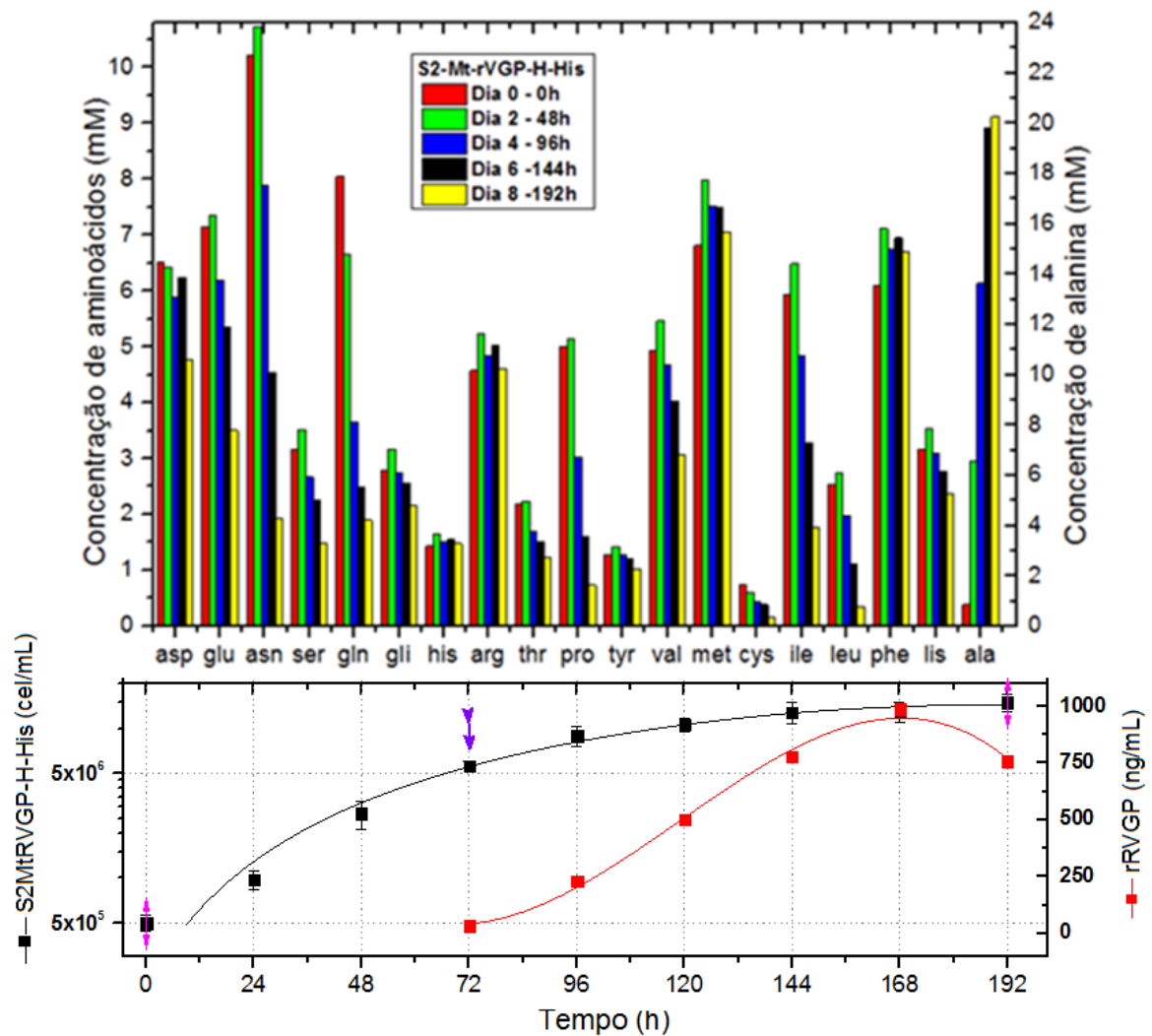
Analisando a Tabela 11 verifica-se que os aminoácidos suplementados no meio Sf-900 II por Swiech *et al.* (2007), prolina e serina, não tiveram modificações em suas quantidades, enquanto o aminoácido suplementado glicina teve concentração reduzida em 135% do meio Sf-900 II para o Sf-900 III. Apesar disso, outros aminoácidos tiveram suas concentrações aumentadas consideravelmente do meio Sf-900 II para o Sf-900 III, como asparagina (21%), arginina (140%), cisteína (61%), fenilalanina (29%) e lisina (32%).

O aminoácido alanina, que é produzido em elevadas quantidades no cultivo de células de inseto como explicado no metabolismo da prolina evidenciado no item 3.5.3.4, teve sua concentração altamente reduzida em 324% do meio Sf-900 II para o Sf-900 III,

o que é uma medida coerente visto que a célula produz quantidades elevadas do mesmo. As concentrações iniciais de glicose e lactato nos meios de cultura Sf-900 II e Sf-900 III apresentaram valores semelhantes.

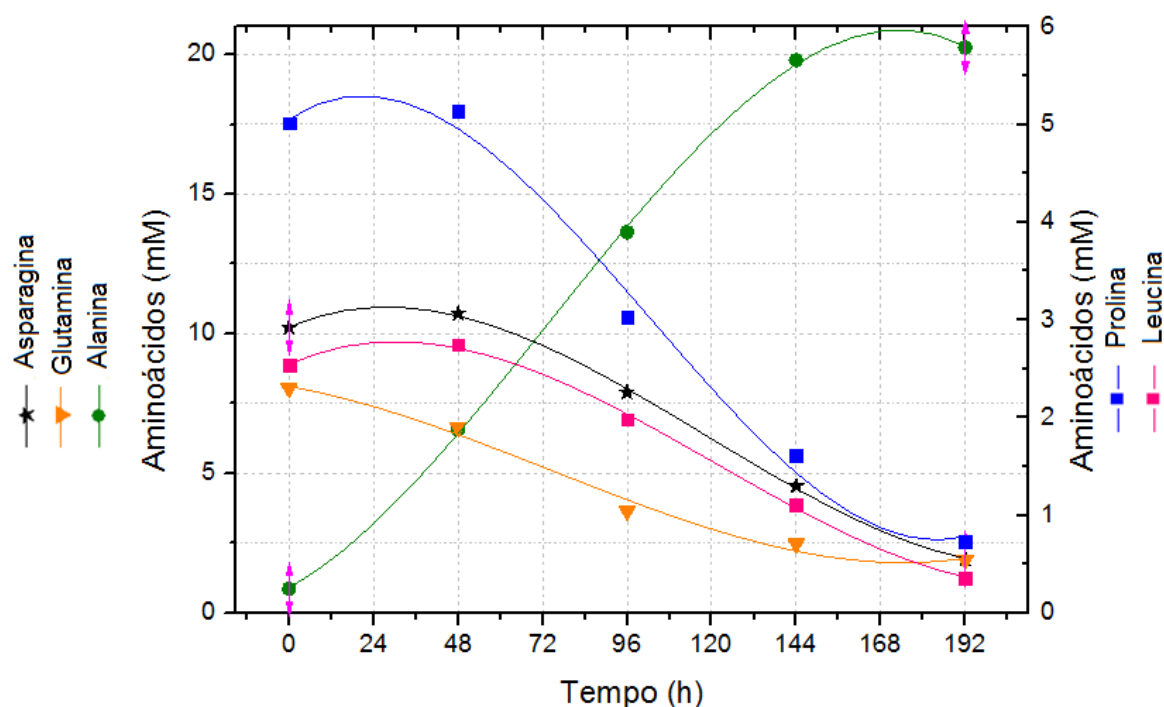
Após análise do meio puro, foi realizado um experimento em frasco Schott para analisar a evolução das concentrações dos aminoácidos durante o cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por CuSO<sub>4</sub>, cujos resultados podem ser visualizados na Figura 20.

Figura 20: Análise da curva de crescimento com o consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de S2MtRBGP-H-His por 192 h, com indução por CuSO<sub>4</sub>. Operado em frasco Schott (V<sub>frasco</sub>=100 mL; V<sub>trabalho</sub>=20 mL), à 28°C, agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo indicado pela seta.



Analisando o gráfico da Figura 20 verificamos que não houve esgotamento de nenhum aminoácido. No entanto, para fins de análise quantitativa, pode-se assumir que os aminoácidos consumidos ou produzidos em níveis iguais ou superiores a 80% são considerados aminoácidos críticos e, portanto, são estudados mais detalhadamente. Nesse experimento foram considerados aminoácidos críticos a asparagina (asn), glutamina (gln), alanina (ala), prolina (pro) e leucina (leu) e foram analisados separadamente na Figura 21.

Figura 21: Evolução do consumo/produção de aminoácidos críticos durante o cultivo com indução com cobre de células S2MtRBGP-H-His por 192 h em frasco Schott à 28°C e agitação 100 rpm.



Os aminoácidos críticos que apresentaram os menores valores foram a leucina, apresentando 0,357 mM em 192 h de cultivo correspondente a 14,1% do valor inicial, a prolina, apresentando 0,736 mM correspondente a 14,7% do valor inicial, a asparagina apresentando 1,932 mM correspondente a 18,9% do valor inicial e a glutamina, apresentando 1,893 mM correspondente a 23,5% do valor inicial. Com esses dados fica evidente que nenhum aminoácido crítico foi esgotado.

Portanto, analisando ambos os gráficos se verifica que não houve esgotamento de nenhum dos 19 aminoácidos analisados e que, portanto, não há necessidade de

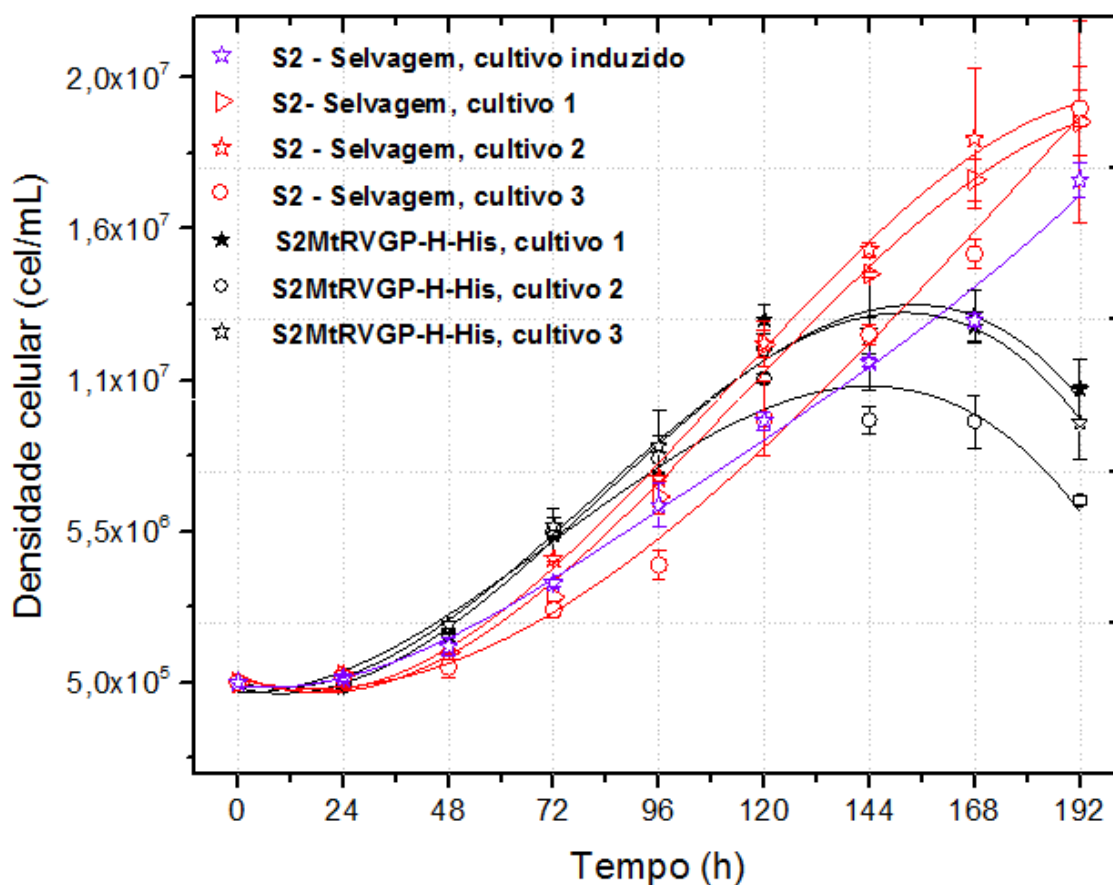


suplementação com aminoácidos ao meio Sf-900 III para o cultivo com indução com  $\text{CuSO}_4$  de células S2MtRVGP-H-His durante 192 h em frasco Schott.

5.1.2 Comparação do metabolismo e da cinética de crescimento entre as células recombinantes S2MtRVGP-H-His e as células S2 selvagens.

Com o intuito de realizar uma análise comparativa do crescimento celular da linhagem selvagem com a linhagem recombinante foram realizados experimentos em triplicata com cada linhagem. Apesar da linhagem S2 selvagem não produzir a rRVGP, mesmo com indução da expressão de metalotioneína por  $\text{CuSO}_4$ , foi realizado um experimento com essa célula na presença desse indutor para analisar seu efeito no metabolismo da célula selvagem. O gráfico dos resultados de crescimento celular comparativo da linhagem selvagem e da recombinante é apresentado na Figura 22.

Figura 22: Comparação da cinética de crescimento entre as linhagens selvagem e recombinante em cultivos realizados em triplicata. Os cultivos 1, 2 e 3 da linhagem S2MtRVGP-H-His e o cultivo induzido da linhagem selvagem receberam a adição de  $\text{CuSO}_4$  em 72 h. Nos demais cultivos não houve adição de  $\text{CuSO}_4$ .



Analisando o gráfico e as curvas de crescimento, realizou-se o cálculo do  $\mu_{\text{máx}}$  de cada cultivo e os resultados são evidenciados na Tabela 12 a seguir:

**Tabela 12: Velocidades específicas de crescimento no cultivo das linhagens S2MtRVGP-H-His e S2- Selvagem realizado em triplicata.**

<b>Linhagem e experimento</b>	<b>Velocidade máxima específica de crescimento (<math>\mu_{\text{máx}}</math>) em <math>\text{h}^{-1}</math> <math>\mu_{\text{máx}} (\pm \text{desvio padrão})</math></b>
S2MtRVGP-H-His, cultivo 1	$0,024 \pm 0,004$ ( $R^2 = 0,949$ )
S2MtRVGP-H-His, cultivo 2	$0,021 \pm 0,005$ ( $R^2 = 0,913$ )
S2MtRVGP-H-His, cultivo 3	$0,021 \pm 0,004$ ( $R^2 = 0,940$ )
S2 – Selvagem, cultivo 1	$0,028 \pm 0,001$ ( $R^2 = 0,994$ )
S2- Selvagem, cultivo 2	$0,029 \pm 0,005$ ( $R^2 = 0,933$ )
S2- Selvagem, cultivo 3	$0,029 \pm 0,003$ ( $R^2 = 0,972$ )
S2 – Selvagem, cultivo com adição de $\text{CuSO}_4$	$0,031 \pm 0,003$ ( $R^2 = 0,976$ )
<b>Média dos cultivos da linhagem S2MtRVGP-H-His</b>	<b><math>0,022 \pm 0,0041</math></b>
<b>Média dos cultivos da linhagem S2- Selvagem</b>	<b><math>0,028 \pm 0,0025</math></b>

Analisando a média da velocidade máxima específica de crescimento celular entre as linhagens recombinante e selvagem ( $\mu_{\text{máx}} = 0,022 \text{ h}^{-1} \pm 0,0041$  para a S2 recombinante;  $\mu_{\text{máx}} = 0,028 \text{ h}^{-1} \pm 0,0025$  para a S2 selvagem), verifica-se que existe diferença significativa entre as velocidades específicas de crescimento ( $p$ -valor = 0,003, portanto  $p < 0,05$  pelo Teste-t).

Além disso, analisando o gráfico verifica-se que ocorrem dois comportamentos diferentes, sendo que o primeiro ocorre no intervalo de 0 a 96 horas, no qual se percebe uma maior semelhança na cinética de crescimento entre as linhagens e o segundo comportamento, que ocorre no intervalo de 96 a 192 horas correspondente à etapa pós-indução, em que as cinéticas de crescimento apresentam comportamentos bem diferenciados dentre as duas linhagens. Lemos *et al.* (2009) apresentaram a imagem das células S2 nas 120 h de cultivo obtida por microscopia confocal, em que é possível a visualização da membrana celular fluorescente na maioria das células S2 recombinantes após a indução com  $\text{CuSO}_4$ , realizada em 72 h de cultivo, que pode ser vista na Seção 3.5.2. Esse fato demonstrou que ao realizar a indução, ocorre um período para que ocorra

a estimulação dos promotores e as células iniciem a expressão da rRVGP, para posteriormente ser incorporadas na membrana celular. A demonstração de que a indução não ocorre, portanto, de uma forma imediata pode justificar o comportamento das curvas de S2 recombinante induzida com 72 h de cultivo, após mais de 24 h, ou seja, com mais de 96 h de cultivo ela ainda se mantém na fase exponencial e apenas após 48 h pós-indução ela começa a apresentar um comportamento bem diferenciados em relação à linhagem selvagem.

Devido a existência desses dois comportamentos, realizou-se uma análise estatística comparativa ponto a ponto do crescimento celular no intervalo que apresentava maior semelhança nas curvas, 0 a 96 horas e os resultados são evidenciados na Tabela 13 a seguir:

**Tabela 13: Análise comparativa ponto a ponto dos cultivos de S2MtRVGP-H-His e S2-Selvagem.**

<b>h</b>	<b>S2MtRVGP-H-His Média dos cultivos 1, 2 e 3 (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>S2- Selvagem Média dos cultivos 1, 2 e 3 (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor de p Teste -t</b>
0	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	---
24	$5,46 \times 10^5$	$7,29 \times 10^5$	0,049
48	$2,19 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$	$9,57 \times 10^{-5}$
72	$5,54 \times 10^6$	$3,62 \times 10^6$	$5,15 \times 10^{-4}$
96	$8,10 \times 10^6$	$6,10 \times 10^6$	0,0094

Assim, analisando ponto a ponto o crescimento celular em cada dia de cultivo evidencia-se que existem diferenças significativas de crescimento celular entre os cultivos da S2MtRVGP-H-His e da S2-Selvagem ( $p < 0,05$ - Teste-t).

Essas diferenças significativas entre as concentrações celulares e as velocidades específicas de crescimento nas duas linhagens são esperadas, visto que a S2MtRVGP-H-His sofreu uma modificação genética que alterou sua capacidade de crescimento em relação à S2 selvagem no meio Sf-900 III. Além disso, com a adição de  $\text{CuSO}_4$  em 72 h para induzir a expressão da rRVGP ocorre uma alteração maior ainda pois a linhagem recombinante passa a consumir nutrientes para crescimento e para expressão da rRVGP, enquanto que a S2 selvagem consome substratos apenas para crescimento.

Outro ponto importante se refere à curva de crescimento da linhagem selvagem que recebeu a indução com cobre, ( $\mu_{\text{máx}} = 0,031 \pm 0,0028$ ,  $R^2 = 0,976$ ) que não sofreu grandes alterações na análise comparativa com a média das curvas da mesma linhagem ( $\mu_{\text{máx}} = 0,028 \pm 0,0025$ ). Isso é um fator positivo visto que o cobre não está exercendo fatores tóxicos ou prejudiciais no cultivo, o que indica que ele apenas exerce o papel de ativador da maquinaria de expressão, não gerando efeitos adversos ao crescimento celular.

Analisando a diferença do comportamento do metabolismo entre as populações de S2 selvagem e S2 recombinante, os resultados de consumo de glicose e de consumo/produção de aminoácidos conduzem a deduções de grande interesse prático. O gráfico correspondente ao consumo de glicose é mostrado na Figura 23, o de consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de células S2MtRBGP-H-His na Figura 24 e o de consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de células S2-Selvagem na Figura 25.

Figura 23: Análise comparativa do consumo de glicose durante o cultivo de células S2 selvagem e S2MtRVGP-H-His por 192 h de cultivo em frasco Schott à 28°C e agitação de 100 rpm.

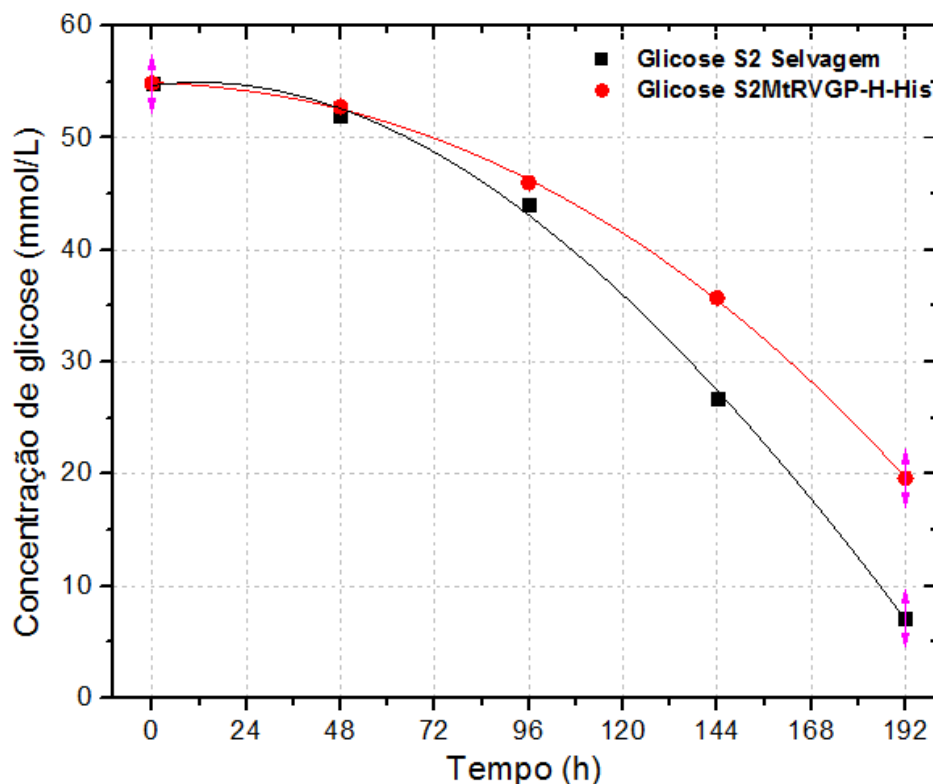


Figura 24: Análise comparativa do consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de células S2MtRBGP-H-His por 192 h de cultivo em frasco Schott à 28°C e agitação de 100 rpm.

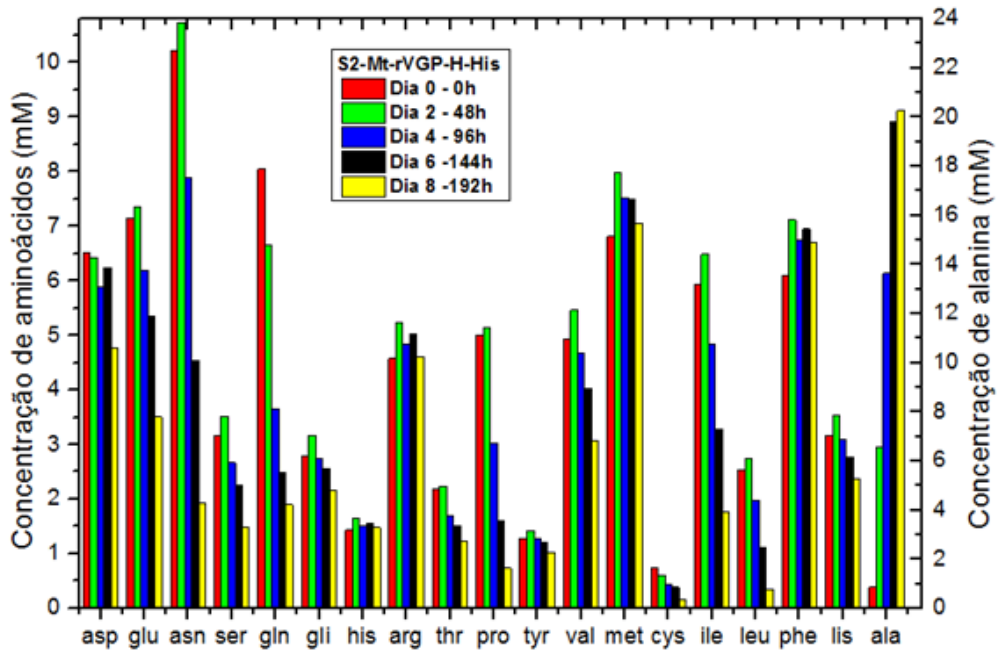
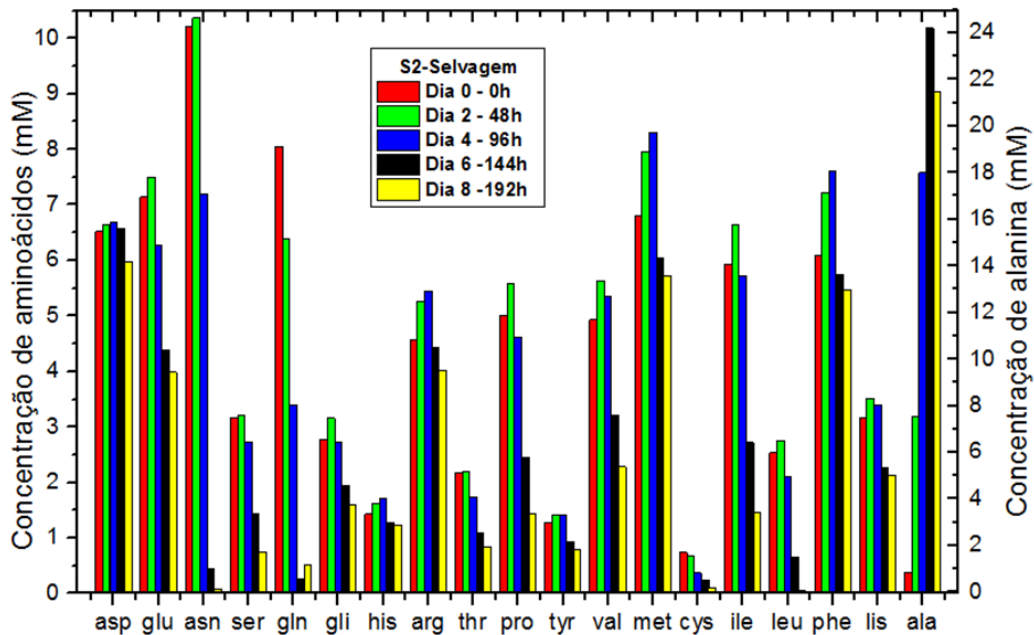


Figura 25: Análise comparativa do consumo/produção de aminoácidos durante o cultivo de células S2 Selvagem por 192 h de cultivo em frasco Schott à 28°C e agitação de 100 rpm.



Como é evidenciado nas curvas de consumo de glicose e aminoácidos, as células da S2 selvagem consomem mais esses compostos que a linhagem recombinante. Os aminoácidos leucina e asparagina, que foram considerados aminoácidos críticos no cultivo da S2 recombinante, restando 14,1% e 18,9% do valor inicial, respectivamente, foram esgotados no cultivo com a S2 selvagem. Além disso, muitos outros aminoácidos foram considerados críticos no cultivo da S2 selvagem, como: glutamina, restando 0,508 mM correspondente à 6,3% do valor inicial e cisteína, restando 0,110 mM correspondente à 14,9% do valor inicial.

Desse modo, com a demonstração das diferenças significativas nas curvas de crescimento e no maior consumo de glicose e aminoácidos pela S2 selvagem em relação a S2 recombinante, ficou evidente que existem diferenças na cinética celular e no comportamento do metabolismo entre as duas linhagens. No entanto, realizando uma análise global das triplicatas comparativas entre ambas as linhagens e essas análises metabólicas, evidencia-se que a modificação genética realizada para obtenção da linhagem recombinante não causou grande impacto na célula, pois possibilitou que a S2 recombinante apresentasse um satisfatório crescimento celular no meio Sf-900 III, com produção da proteína recombinante de interesse.

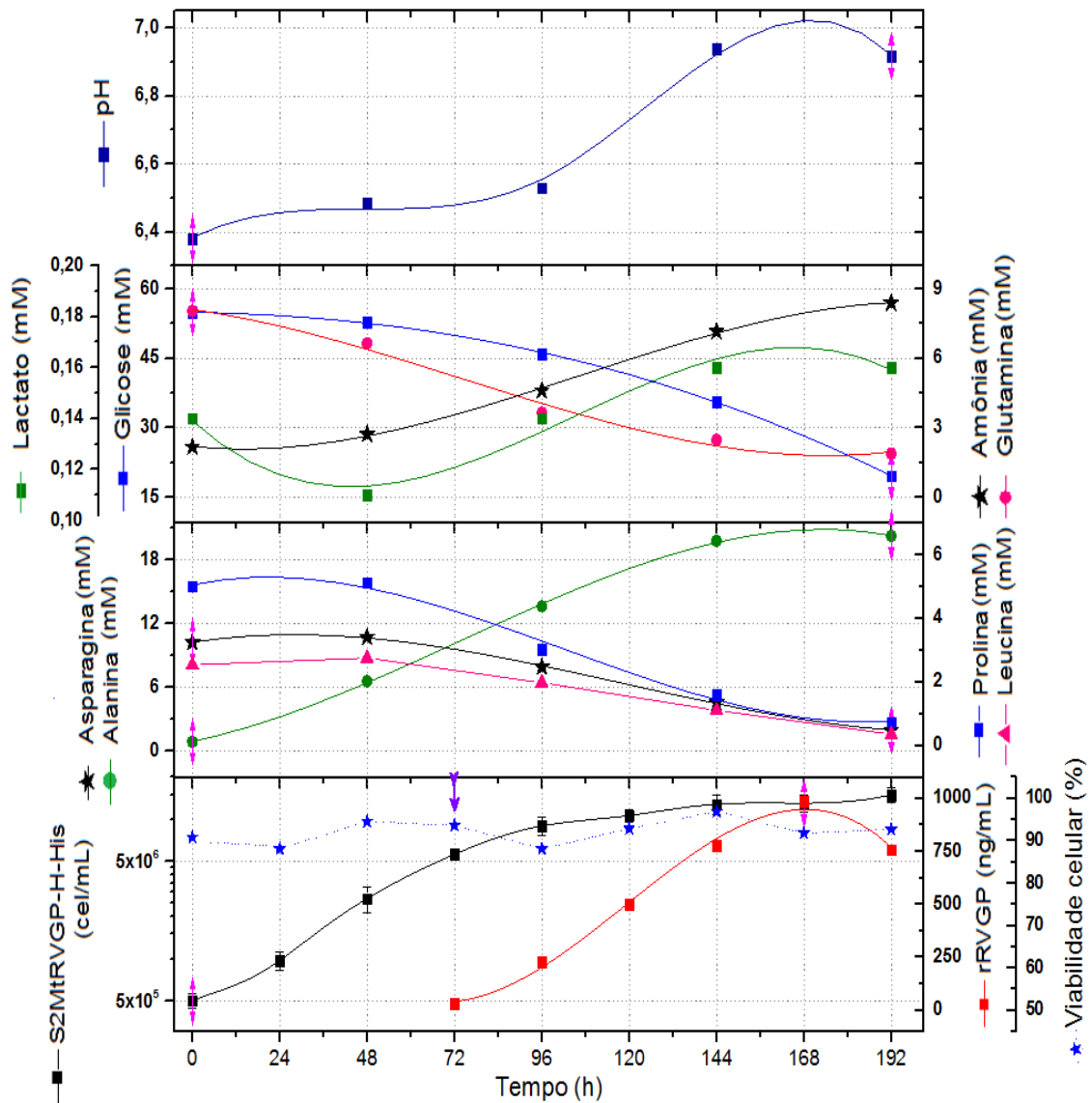
### 5.1.3 Estudo da temperatura ótima de cultivo para as células S2MTRVGP-H-His e expressão da RVGP.

As células de inseto apresentam a versatilidade de crescerem facilmente a temperaturas mais baixas que as células de mamíferos, que podem variar de 22°C à 28°C (MORAES *et al.*, 2008). Apesar de a maioria dos autores utilizarem temperatura próxima de 28°C, Rossi *et al.* (2008) demonstraram em seus experimentos com a linhagem S2 recombinante S2AcGPC2K com promotor constitutivo que a diminuição da temperatura de cultivo para 20°C favorecia a produção da rRVGP. Devido a esses fatores, três experimentos foram planejados para investigar a influência da temperatura nas características cinéticas, fisiológicas e de capacidade de expressão da rRVGP pelas células recombinantes S2MtRVGP-H-His em três diferentes temperaturas dentro dessa faixa.

Estudos de Ventini *et al.* (2010, 2014) e Lemos *et al.* (2009) demonstraram que o período mais conveniente para realizar a indução da expressão da rRVGP em cultivo seria quando a densidade celular apresentasse valores na faixa de 3 a  $5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>, os quais podem ser atingidos em 48 h ou 72 h, dependendo das condições de cultivo, e que o

procedimento de indução seria padronizado em uma única adição de  $\text{CuSO}_4$ . Levando em consideração esses dados, os experimentos do estudo da temperatura ótima de cultivo obedeceram a esses critérios. Os três experimentos seguiram o protocolo padronizado do cultivo em frasco Schott, apresentando como única diferença a temperatura do cultivo celular. Os experimentos foram denominados da seguinte forma: Experimento 1: Temperatura de 28°C; Experimento 2: Temperatura de 25°C; Experimento 3: Temperatura de 22°C. O gráfico completo do Experimento 1 está apresentado na Figura 26 a seguir.

Figura 26: Resultados do Experimento 1 do cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CuSO}_4$ , em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}}=20 \text{ mL}$ ), à 28°C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo indicado pela seta no gráfico.



Verifica-se no Experimento 1 que o pH variou de 6,37 até 6,91, o  $\mu_{\text{máx}}$  foi  $0,034 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,990$  e a densidade máxima de células ( $X_{\text{máx}}$ ) foi de  $1,49 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ . A indução com  $\text{CuSO}_4$  foi realizada com 72 h de cultivo e a concentração máxima de rRVGP no cultivo foi de  $0,99 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além disso, foram identificados 5 aminoácidos críticos durante o cultivo: prolina; leucina; alanina; asparagina e glutamina, porém não houve esgotamento de nenhum deles ou de glicose, que atingiu uma concentração de  $3,53 \text{ g.L}^{-1}$  em 192h. A produção máxima de amônia alcançou 8,4 mM e a de alanina alcançou 20,2 mM.

Apesar de a densidade celular ter aumentado entre a 168 e 192 h de cultivo, a concentração da glicoproteína diminuiu. Essa queda pode ocorrer por diversas causas, dentre as quais podem-se citar: escassez de oxigênio; liberação de proteases em solução; perda da estabilidade de expressão; mudanças conformacionais na estrutura proteica e ainda, possível desnaturação de uma parte da proteína.

A escassez de oxigênio está relacionada ao fato de que conforme a densidade celular alcança valores elevados, diminui a disponibilidade de oxigênio dissolvido (MORAES *et al.*, 2008). Da mesma forma, quanto maior a velocidade de crescimento celular, mais rápido a concentração de oxigênio dissolvido atinge baixos valores, culminando com a limitação do crescimento celular. Além disso, esse fato pode ser uma das razões para explicar o comportamento das curvas de crescimento de forma oscilatória após o final da fase de crescimento celular, visto que, inicialmente o oxigênio dissolvido está disponível para um número razoável de células e à medida que a população cresce, esse valor se torna limitante e induz a morte celular de uma parcela da população. Como essas células morrem, a quantidade do oxigênio que elas utilizavam volta a ficar disponível no cultivo, que juntamente com nutrientes em solução, propiciam o aumento da densidade celular, a qual novamente provoca a queda de oxigênio dissolvido a valores limitantes de crescimento. No entanto, outra razão que pode estar relacionada às oscilações nas curvas de crescimento é a formação de aglomerados celulares, como foi evidenciado na Figura 6 da seção 3.5 e que será apresentada na Figura 34 da seção 5.1.4, que podem dificultar as medidas de densidade celular.

A liberação de proteases em solução por células lisadas na fase estacionária e de declínio pode dar início à degradação das proteínas através da clivagem proteolítica, mecanismo comum para essa classe de enzimas. (MORAES *et al.*, 2008; ALBERTS *et al.*, 2004).



A perda de estabilidade da expressão de proteínas recombinantes em células animais é um fator frequentemente citado na literatura (BARNES *et al.*, 2001). Ela está relacionada à perda do gene recombinante da proteína de interesse pela célula e pelo surgimento de populações de células não produtoras, que normalmente possuem vantagens em relação as produtoras e culminam na diminuição global de produção de proteína recombinante no processo. No entanto, a linhagem recombinante desse estudo sofreu uma pressão seletiva recente, anteriormente ao início de cada experimento, indicando assim que este fator provavelmente não é contribuinte para a diminuição da concentração de rRVGP obtida.

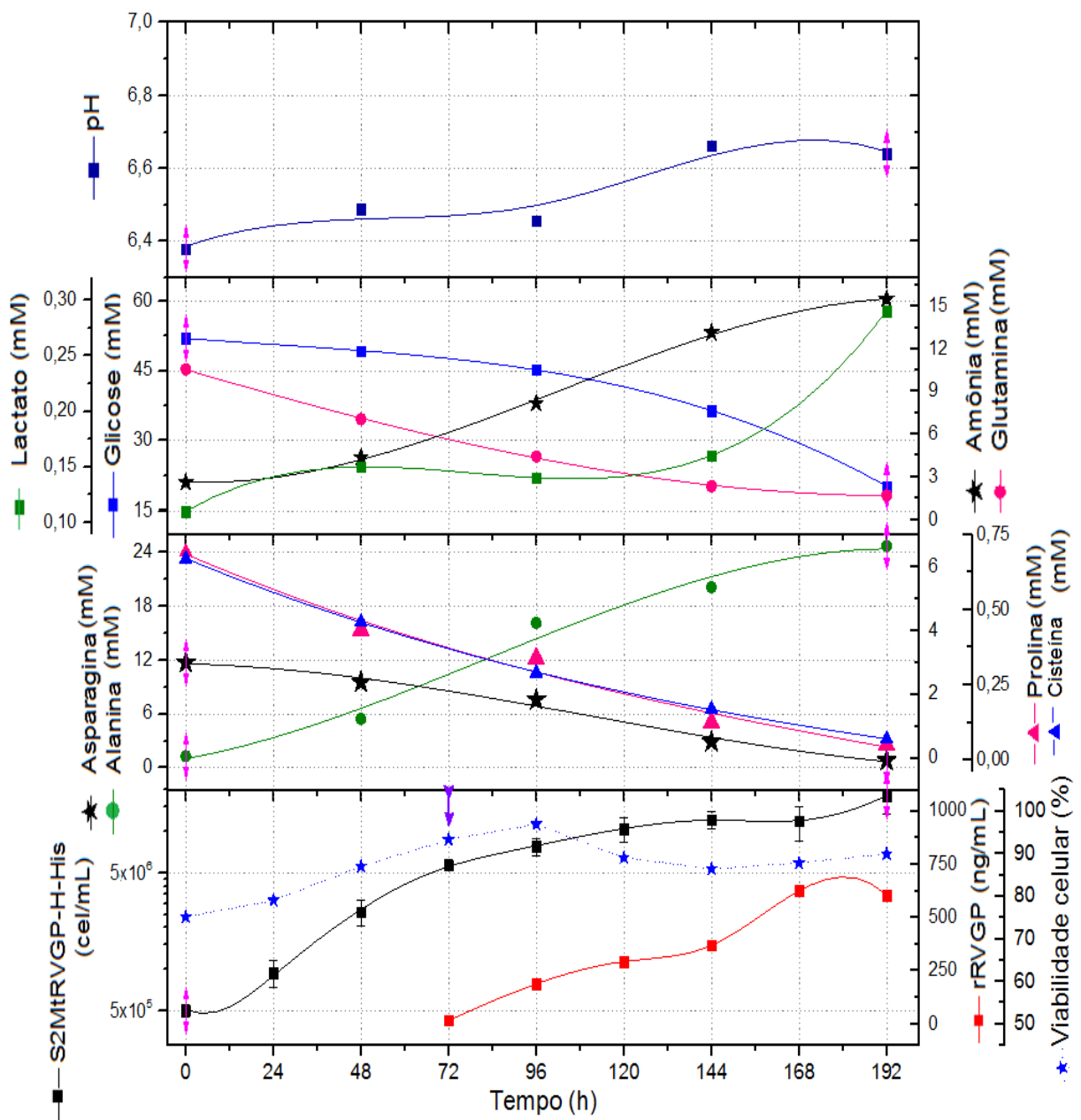
As mudanças conformacionais na estrutura proteica da glicoproteína do vírus da raiva foram propostas por Gaudin *et al.* (2002), sugerindo a existência de três diferentes conformações assumidas pela RVGP, dependentes do pH do meio circundante. A conformação N, denominada estado nativo, é detectada em torno de pH 7,0 responsável pela ligação do vírus com o receptor celular. A conformação A, denominada estado ativado, possui antigenicidade e morfologia muito similar ao estado N, é detectada imediatamente após acidificação devido a indução de formação de agregados virais estabilizados a baixo pH e baixa temperatura, a qual inicia o processo de fusão vírus-membrana da célula, não aplicável ao presente caso. A conformação I, denominada conformação fusional inativa, é detectada após um período prolongado a baixo pH. Nessa conformação, o ectodomínio da rRVGP é maior que o encontrado na conformação N e antigenicamente distinto. No entanto, diferentemente de outras glicoproteínas fusogênicas virais, a glicoproteína do vírus da raiva na conformação inativa (I) retorna à conformação nativa (N) quando reincubada em pH acima de 7. Gaudin *et al.* (2002) demonstram dessa forma, a ocorrência do equilíbrio químico entre os diferentes estados da rRVGP entre a faixa de pH correspondente à 6 e 7,5.

O aumento do pH de 6,3 a 6,9 durante o cultivo leva a crer que provavelmente a glicoproteína possa ter sofrido alterações conformacionais em sua estrutura. No entanto, essa alteração do pH pode ser vista como favorável, visto que o pH ótimo de crescimento da célula S2 é em torno 6,2 (MORAES *et al.*, 2008) e o pH ótimo da glicoproteína do vírus da raiva é em torno de 7,2 (GAUDIN *et al.*, 2002; VENTINI *et al.*, 2014). Dessa forma, a variação do pH observada nos cultivos pode ser considerada benéfica à expansão celular e à posterior expressão da proteína, de modo que, quando a célula precisa se adaptar e entrar na fase exponencial de crescimento, o pH está favorável ao seu crescimento (em torno de 6,2). Por outro lado, quando a glicoproteína começa a ser

expressa, que corresponde ao final da fase de crescimento, o pH está mais elevado, chegando a valores próximos do pH ótimo 7,2 da proteína. Por essa razão, em nenhum experimento do presente trabalho houve preocupação com o controle do pH.

Os resultados do segundo Experimento, realizado à temperatura de 25°C podem ser analisados no gráfico da Figura 27 a seguir.

Figura 27: Resultados do Experimento 2 do cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192h com indução por  $\text{CuSO}_4$ , em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}}= 20 \text{ mL}$ , à 25°C, com agitação de 100 rpm e indução à 72h do cultivo, indicado pela seta no gráfico.

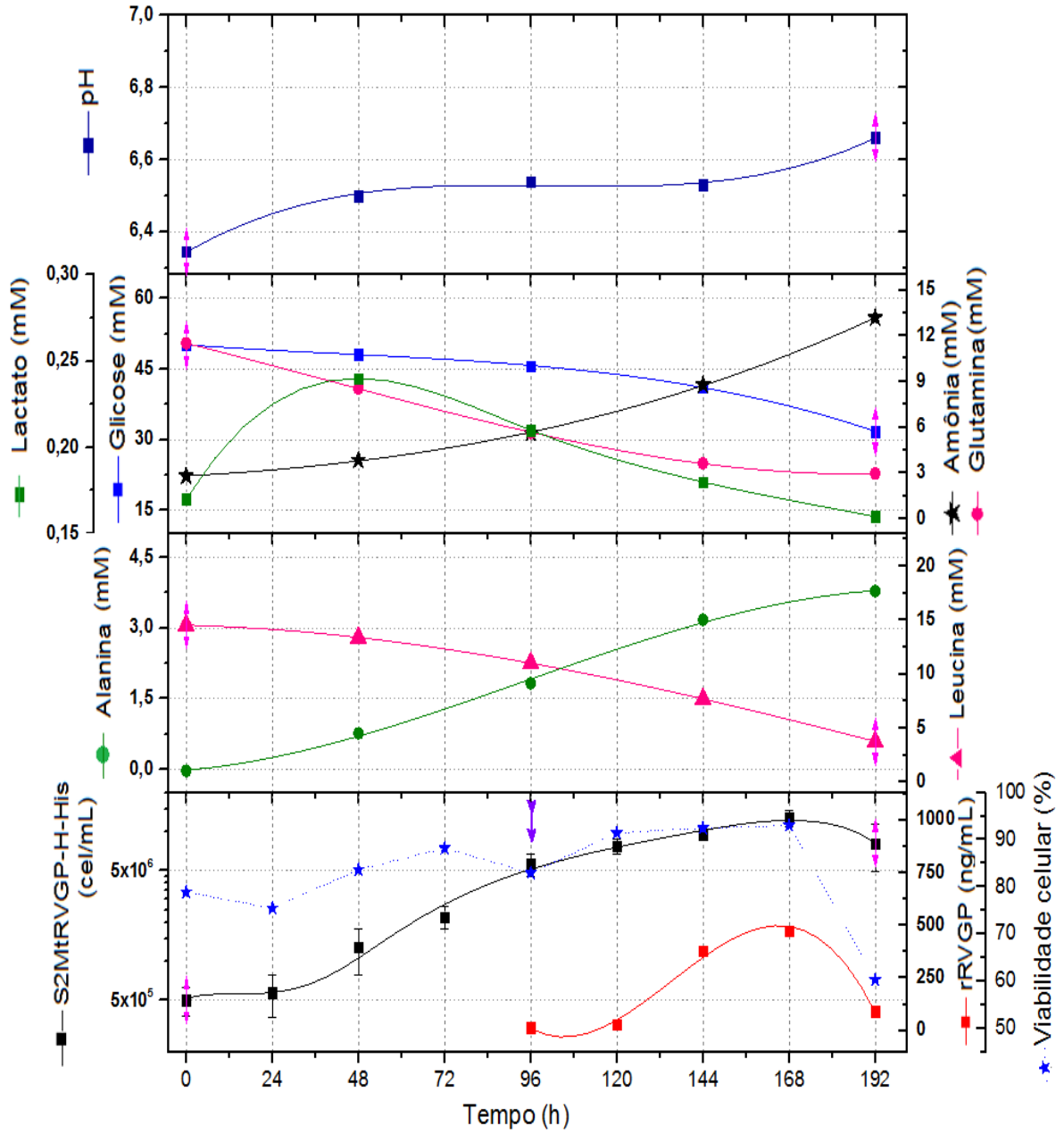


No Experimento 2 o pH variou de 6,38 até 6,64, o  $\mu_{\text{máx}}$  foi de  $0,034 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,989$  e  $X_{\text{máx}}$  foi de  $1,82 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ . A indução com  $\text{CuSO}_4$  foi realizada com 72 h de cultivo e a produção máxima de rRVGP foi de  $0,62 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foram identificados 5 aminoácidos críticos durante o cultivo, sendo 4 deles semelhantes aos do Experimento 1: prolina; cisteína; alanina; arparagina e glutamina, porém não houve esgotamento de nenhum aminoácido ou de glicose em 192 h de cultivo. A produção máxima de amônia alcançou 15,5 mM e a de alanina alcançou 24,7mM.

As curvas de crescimento do Experimento 1 em relação ao Experimento 2 foram semelhantes, porém no intervalo de 168 a 192 horas a curva do crescimento à 25°C (Experimento 2) apresentou um melhor resultado, confirmado pela densidade máxima celular alcançada nos experimentos,  $1,82 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$  no Experimento 2 em relação à  $1,49 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$  do Experimento 1. No entanto, apesar da maior densidade celular apresentada pelo Experimento 2, também pode ter ocorrido degradação da glicoproteína. Apesar do valor de rRVGP em 168 h ( $0,626 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ter sido semelhante ao de 192 h ( $0,606 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), essa degradação pode ser inferida pelo fato de que a densidade celular aumentou de  $1,19 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$  para  $1,82 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ , o que seria acompanhado por um aumento da expressão da rRVGP, sugerindo, portanto, que uma fração da proteína pode ter sido degradada.

O terceiro Experimento, que buscou o estudo de todo o cultivo à temperatura de 22°C pode ser analisado no gráfico completo do Experimento 3 apresentado na Figura 28 a seguir.

Figura 28: Resultados do Experimento 3 do cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por CuSO<sub>4</sub>, em frasco Schott (V<sub>frasco</sub>= 100 mL; V<sub>trabalho</sub>= 20 mL), à 22°C, com agitação de 100 rpm e indução à 96 h do cultivo, indicado pela seta no gráfico.



No Experimento 3 o pH oscilou de 6,34 até 6,59, a  $\mu_{\text{máx}}$  foi de  $0,031 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,985$  e a  $X_{\text{máx}}$  foi de  $1,27 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ . A indução com  $\text{CuSO}_4$  foi realizada com 96 h de cultivo (em 72 h de cultivo não havia alcançado a faixa de indução inicialmente utilizada) e a produção máxima de glicoproteína do cultivo foi  $0,47 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foi identificado apenas 1 aminoácido crítico durante o cultivo, leucina, porém não houve esgotamento de nenhum aminoácido ou de glicose. A concentração máxima de amônia alcançou 13,2 mM e a de alanina alcançou 17,7mM.

A curva de crescimento do Experimento 3 em relação ao Experimento 1 e Experimento 2 apresentou valores de densidade celular inferiores, porém a célula S2 demonstrou capacidade de crescer na temperatura mais baixa do intervalo dos valores indicados na literatura,  $22^\circ\text{C}$  à  $28^\circ\text{C}$  (MORAES *et al.*, 2008). Além disso, embora os valores de velocidades específicas de crescimento apresentem valores decrescentes conforme diminuimos a temperatura de cultivo para  $22^\circ\text{C}$ , eles demonstraram valores semelhantes:  $\mu_{\text{máx}} 0,034 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,990$  no Experimento 1 ( $28^\circ\text{C}$ );  $\mu_{\text{máx}} 0,034 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,989$  no Experimento 2 ( $25^\circ\text{C}$ ) e  $\mu_{\text{máx}} 0,031 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,985$  no Experimento 3 ( $22^\circ\text{C}$ ).

Como a curva de crescimento do Experimento 3 demonstrou uma velocidade de crescimento menor, a indução foi realizada 24 h após que nos Experimentos 1 e 2 e os valores de expressão da glicoproteína nesse experimento foram bem inferiores que os valores nas temperaturas maiores. A  $r\text{RVGP}_{\text{máx}}$  do cultivo à  $22^\circ\text{C}$  apresentou  $0,47 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e a  $r\text{RVGP}_{\text{máx}}$  do cultivo à  $28^\circ\text{C}$  apresentou  $0,99 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , portanto o Experimento 3 apresentou cerca de metade da produtividade de glicoproteína em relação ao Experimento 1. Esse fato pode ser uma das razões do cultivo à  $22^\circ\text{C}$  ter apresentado apenas 1 aminoácido com concentrações críticas, em relação aos 5 aminoácidos apresentados como críticos nos Experimentos 1 e 2. Como a célula utiliza os aminoácidos disponíveis no meio de cultura para proliferação e para sintetizar a glicoproteína, sua menor velocidade de crescimento e inferior produção de rRVGP podem ser as causas para as concentrações de aminoácidos disponíveis no meio permanecerem elevadas.

Um comportamento interessante que foi observado no Experimento 3 é que no final do cultivo (168 - 192 h) houve uma queda na expressão da rRVGP (como ocorreu nos Experimentos 1 e 2), porém a queda foi acompanhada da redução da densidade celular, diferentemente dos Experimentos 1 e 2 em que houve aumento da densidade celular. Dessa forma, no Experimento 3 não podemos afirmar que houve degradação da glicoproteína nesse momento do cultivo pois a queda da densidade celular poderia justificar a queda da expressão da rRVGP, visto que a quantidade de glicoproteína produzida é dependente do número de células viáveis no cultivo naquele momento.

A análise comparativa da cinética do crescimento celular e de produção da rRVGP dos Experimentos 1, 2 e 3 podem ser visualizadas na Figura 29 e a curva da expressão em função da densidade celular pode ser visualizada na Figura 30.

Figura 29: Resultados obtidos nos experimentos em frasco Schott de células S2MtRVGP-H-His em diferentes temperaturas de cultivo: 28, 25 e 22°C, operado em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}} = 100 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}} = 20 \text{ mL}$ ) com agitação de 100 rpm.

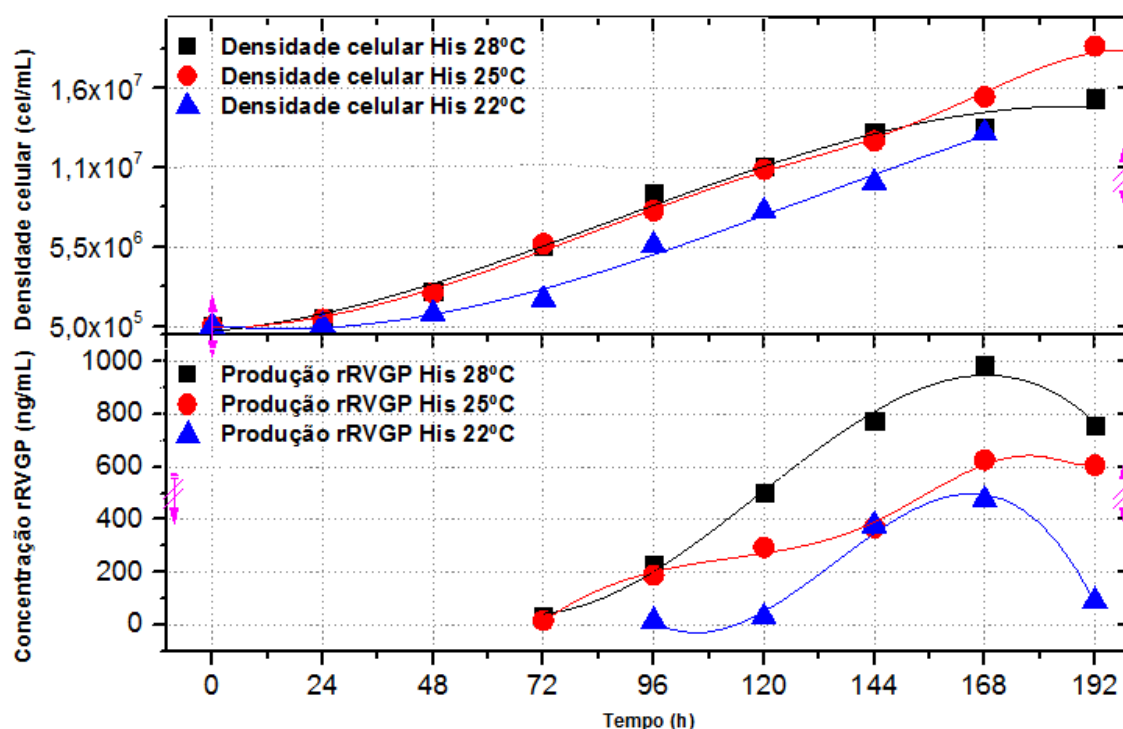
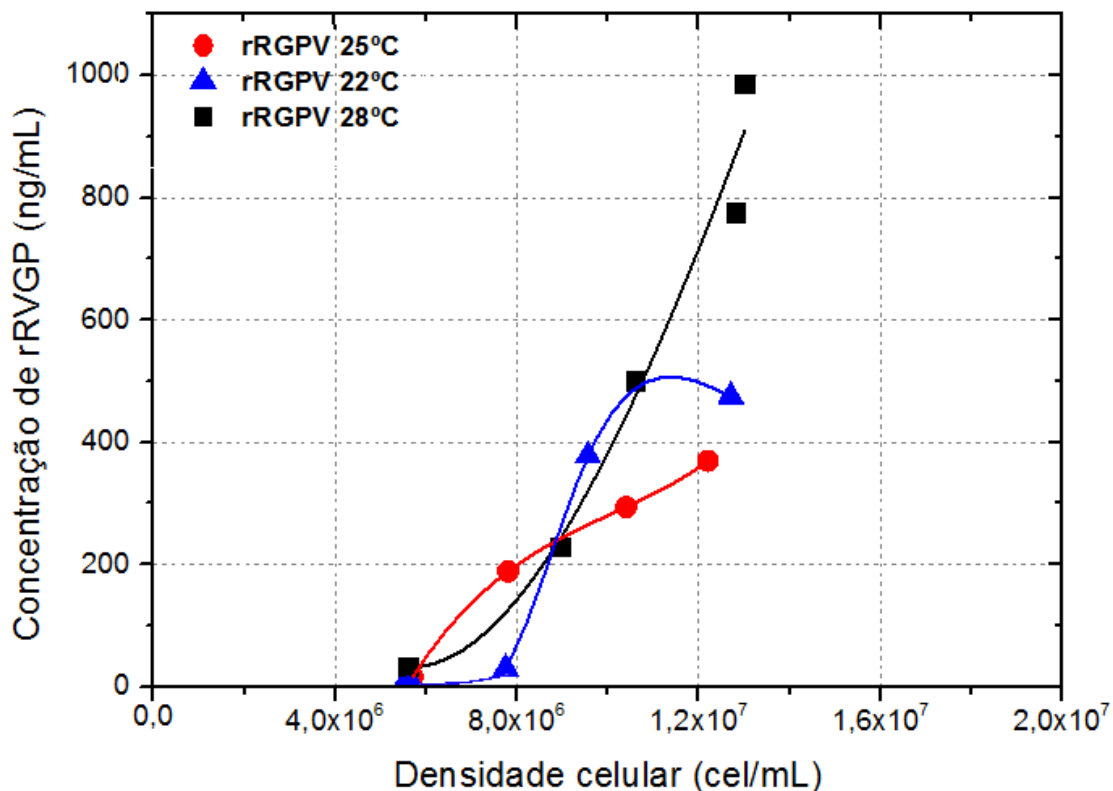


Figura 30: Resultados de produção de rRVGP em frasco Schott durante o cultivo de células S2MtRBGP-H-His nos Experimentos 1, 2 e 3, em função da densidade celular, operado em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}} = 100 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}} = 20 \text{ mL}$ ) com agitação de 100 rpm.



Com base na análise de cada experimento separadamente (Figura 26, 27 e 28), pelos gráficos do estudo comparativo dos três experimentos (Figura 29) e pela curva de produção de rRVGP em função da densidade celular (Figura 30) observamos que a temperatura correspondente à 28°C apresentou os melhores resultados de produção da glicoproteína do vírus da raiva. Com base nessa análise, definiu-se a temperatura de 28°C como a mais apropriada para prosseguimento da pesquisa.

#### 5.1.4 Definição do tempo ideal da adição de $\text{CuSO}_4$ para indução da expressão da rRVGP

A necessidade do estudo do momento ideal da indução da expressão da rRVGP com  $\text{CuSO}_4$  surgiu devido aos estudos discutidos a seguir, que foram encontrados na literatura. De acordo com os estudos de Astray *et al.* (2013, 2014), Lemos *et al.* (2009) e Ventini *et al.* (2010, 2014) quando o  $\text{CuSO}_4$  é adicionado em solução, ele atua sobre os fatores de transcrição que estimulam o promotor no genoma da célula a produzir a metalotioneína e estimulam também, esse mesmo promotor presente no plasmídeo da

linhagem recombinante. Como o gene da rRVGP é transfetado acoplado a esse mesmo promotor, utiliza-se, portanto, do mesmo sistema para iniciar a produção da metalotioneína e da rRVGP após a exposição das células ao cobre. Por outro lado, Norgate *et al.* (2010), identificaram o gene de *Drosophila melanogaster*, denominado *Syntaxin 5*, que desempenha o importante papel de regulador das concentrações de cobre e mostrou que apesar do cobre ser essencial para a vida anaeróbica, muitos aspectos de sua captação e distribuição celular precisam ser completamente elucidados. Em seus estudos foi demonstrado que o comportamento desse gene está associado à captação e transporte do cobre no meio intracelular, de forma que o gene *Syntaxin 5* desempenha papel essencial na homeostase do cobre em *Drosophila melanogaster*, fazendo com que concentrações elevadas de cobre em solução possam ser tóxicas às células.

Com base nesse cenário, adicionado ao fato dos Experimentos 1, 2 e 3 terem sido desenvolvidos seguindo a faixa de indução previamente estabelecida,  $3 \text{ a } 5 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  (VENTINI *et al.*, 2010, 2014 e LEMOS *et al.*, 2009) e os experimentos de análise metabólica entre a S2 recombinante e a S2 selvagem terem demonstrados alterações no crescimento celular após um período de indução, foram propostos experimentos para identificar o melhor momento de indução visando uma maior produção de glicoproteína recombinante. Esse desenvolvimento deve englobar características que favoreçam o crescimento celular inicial e que após a adição de cobre em solução, as células consigam continuar o crescimento e expressão de rRVGP, evitando efeitos de toxicidade e de falta de captação e transporte do cobre no meio intracelular, que conduziriam à falta de ativação da maquinaria celular de expressão da glicoproteína.

Os quatro experimentos seguiram o protocolo padronizado do cultivo em frasco Schott, sendo realizados à temperatura ótima de 28°C tendo como única diferença o dia da adição de  $\text{CuSO}_4$  para indução da expressão da rRVGP.



Os experimentos foram denominados da seguinte forma:

- Experimento 1: Indução à 72 h do cultivo celular (realizado na etapa anterior);
- Experimento 4: Indução à 0 h do cultivo celular;
- Experimento 5: Indução à 24 h do cultivo celular;
- Experimento 6: Indução à 48 h do cultivo celular.

Na Figura 31 se apresenta o gráfico comparativo de crescimento celular e produção da rRVGP nos quatro tempos de indução e na Figura 32 a gráfico de produção de rRVGP em função da densidade celular.

Figura 31: Análise comparativa dos quatro tempos de indução (0, 24, 48 e 72 h) da expressão de rRVGP por  $\text{CuSO}_4$  no cultivo da célula S2MtRVGP-H-His em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}} = 100 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}} = 20 \text{ mL}$ ), à  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm.

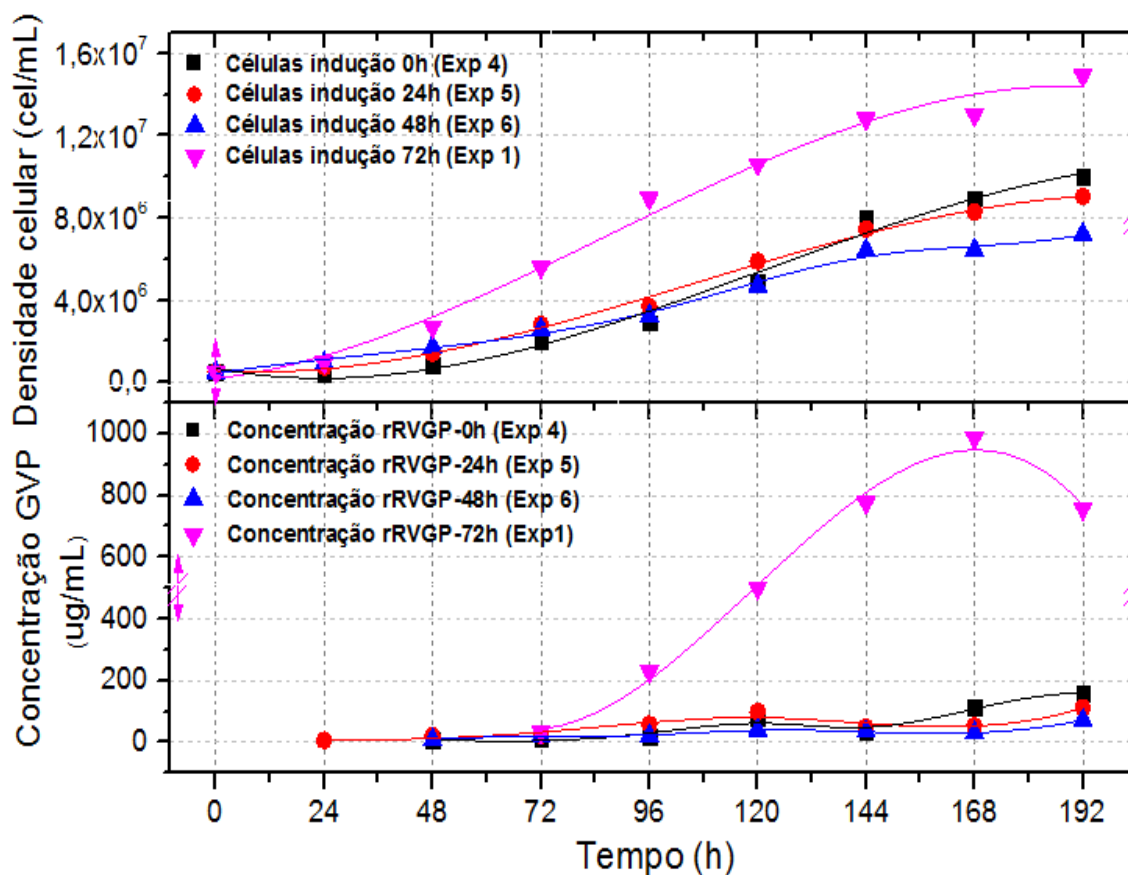
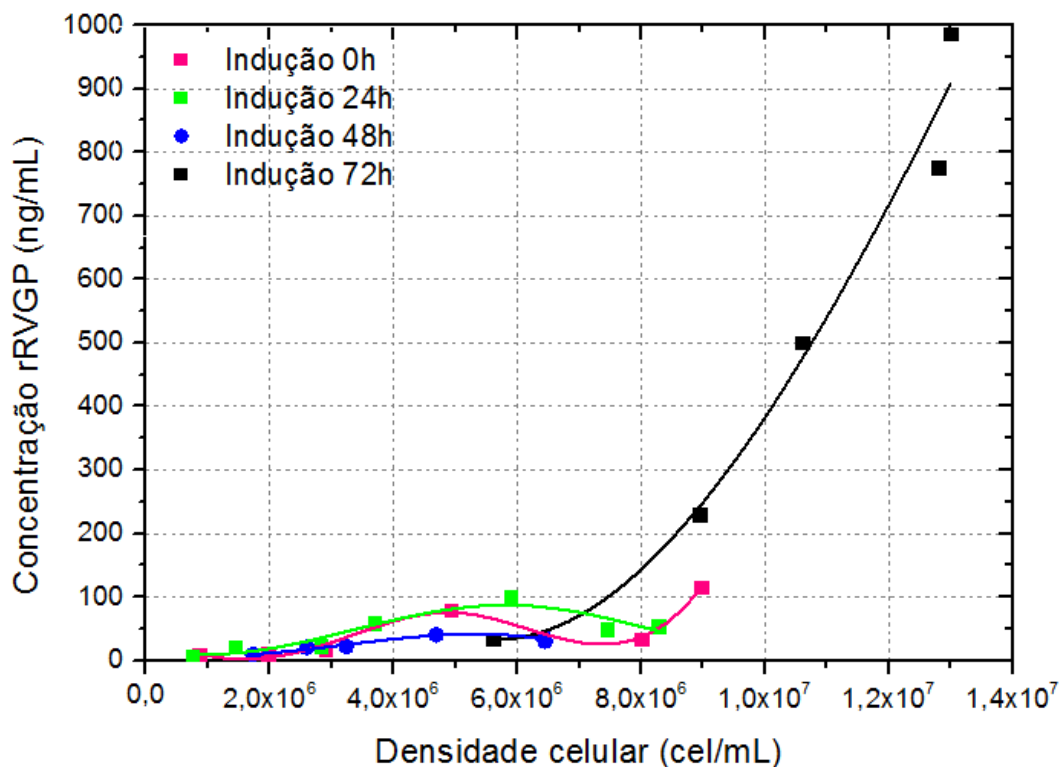


Figura 32: Análise comparativa da produção de rRVGP no cultivo da célula S2MtRVGP-H-His em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100\text{ mL}; V_{\text{trabalho}}=20\text{ mL}$ ),  $T:28^{\circ}\text{C}$ , agitação de 100 rpm em quatro tempos de indução da expressão por  $\text{CuSO}_4$  (0, 24, 48 e 72 h), em função da densidade celular.



Analisando os gráficos das Figuras 31 e 32, juntamente com os dados dos quatro momentos distintos de indução: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h do cultivo da célula S2MtRVGP-H-His encontrados na Tabela 14 a seguir, percebe-se que conforme maior o intervalo de tempo entre o inóculo e a indução da rRVGP, melhor a adaptação das células ao cultivo, que por sua vez culmina numa maior densidade celular no final do cultivo.

**Tabela 14: Densidade celular final dos quatro tempos de adição de  $\text{CuSO}_4$  (0 h, 24 h, 48 h e 72 h) no cultivo da célula S2MtRVGP-H-His em meio Sf-900 III, realizados em frasco Schott.**

Tempo (h)	Indução 0 h (Exp 4)	Indução 24 h (Exp 5)	Indução 48 h (Exp 6)	Indução 72 h (Exp 1)
	Densidade celular ( $\text{cel.mL}^{-1}$ )			
0	5,00E+05	5,00E+05	5,00E+05	5,00E+05
24	4,20E+05	7,50E+05	9,58E+05	9,70E+05
48	8,68E+05	1,44E+06	1,73E+06	2,70E+06
72	1,98E+06	2,83E+06	2,60E+06	5,60E+06

Observando a Tabela 12 é possível perceber que no momento em que as células estão em período de adaptação no intervalo entre 0 e 24 h de cultivo, a densidade celular diminui por causa de morte celular (Experimento 4: indução 0 h), enquanto que nos experimentos com induções mais tardias, a densidade celular apresentou valores crescentes com o aumento do tempo de indução. A adição de  $\text{CuSO}_4$  na fase de adaptação celular até as 48 h não apresentou bons resultados em termos de  $X_{\text{max}}$  e  $\mu_{\text{max}}$ , como se pode verificar nos valores resumidos a seguir:

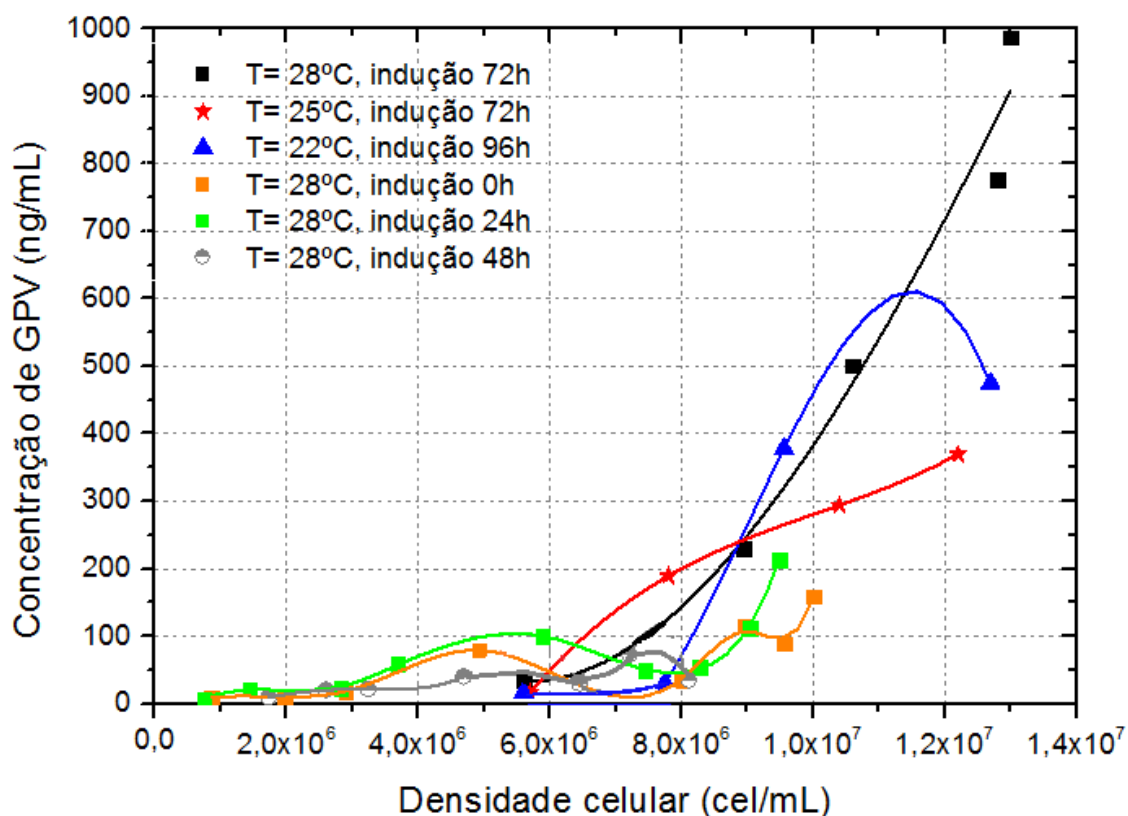
- Indução 0 h:  $X_{\text{máx}} 1,0 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{máx}} 0,028 \text{ h}^{-1} \pm 0,003$ ,  $R^2 = 0,966$ ;
- Indução 24 h:  $X_{\text{máx}} 9,5 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{máx}} 0,022 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,962$ ;
- Indução 48 h:  $X_{\text{máx}} 8,1 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{máx}} 0,022 \text{ h}^{-1} \pm 0,003$ ,  $R^2 = 0,961$ ;
- Indução 72 h:  $X_{\text{máx}} 1,5 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{máx}} 0,034 \text{ h}^{-1} \pm 0,002$ ,  $R^2 = 0,990$ .

Dessa forma, pode-se afirmar que o crescimento celular, a produção da glicoproteína e a velocidade específica de crescimento apresentaram melhores resultados no tempo de adição de  $\text{CuSO}_4$  de 72 h. Vale ressaltar que outros horários de indução mais tardios, como 96 h ou 120 h não foram analisados visto que, como demonstrado acima, a indução da rRVGP leva um período entre 24 a 48 h para ser completada, podendo levar a uma situação adversa de crescimento e expressão de rRVGP como demonstrado anteriormente no item 5.1.3. Portanto, com base nesses resultados definiu-se que o tempo de adição de  $\text{CuSO}_4$  para a indução de expressão de rRVGP em 72 h seria o mais apropriado para o cultivo da célula S2MtRVGP-H-His em meio Sf-900 III.

Para comparação dos resultados obtidos nos experimentos de 1 a 6, o gráfico da Figura 33 mostra uma síntese da relação entre a concentração de rRVGP em função da densidade celular dos seis experimentos realizados para definição da temperatura e tempo de adição de  $\text{CuSO}_4$  mais apropriados para conseguir altos rendimentos de rRVGP, sendo eles:

- Experimento 1: Temperatura de 28°C, indução 72 h;
- Experimento 2: Temperatura de 25°C, indução 72 h;
- Experimento 3: Temperatura de 22°C, indução 96 h;
- Experimento 4: Indução à 0 h do cultivo celular, 28°C;
- Experimento 5: Indução à 24 h do cultivo celular, 28°C;
- Experimento 6: Indução à 48 h do cultivo celular, 28°C.

Figura 33: Resumo comparativo da produção de rRVGP em função da densidade celular nos cultivos de células S2MtRVGP-H-His em frasco Schott para definição da temperatura e tempo de adição de  $\text{CuSO}_4$  apropriados para produção eficiente de rRVGP.



Sendo assim, com a análise dos experimentos de temperatura (Figuras 26, 27, 28, 29 e 30) e dos experimentos de indução (Figuras 31 e 32) observamos que as condições de cultivo que apresentaram os melhores resultados foram à 28°C de temperatura e 72 h como tempo ideal de adição de  $\text{CuSO}_4$  com  $\text{rRVGP}_{\text{máx}}$  de  $0,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

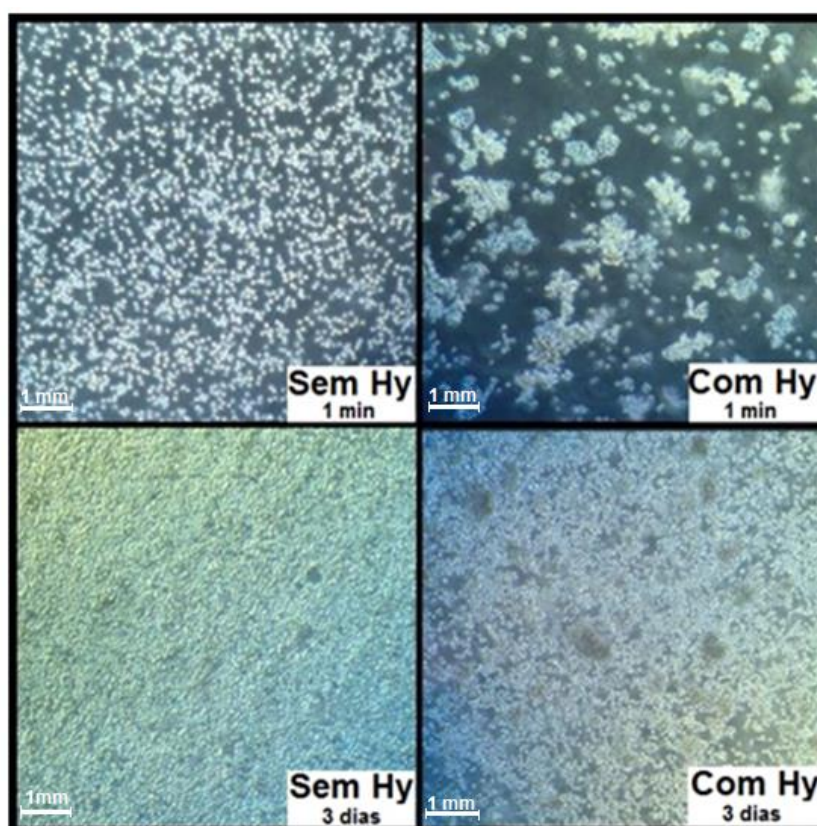
Dessa forma, com esses seis experimentos encerrara-se o estudo em pequena escala (20 mL) das células S2MtRVGP-H-His e inicia-se o estudo em larga escala (650 mL), na qual serão utilizados os parâmetros identificados como mais satisfatórios nesta primeira parte dos trabalhos.

Por fim, em termos de observações laboratoriais de trabalho com a linhagem S2, observou-se que imediatamente após a adição do antibiótico aminoglicosídico Higromicina B para seleção das células recombinantes, ocorria aglomeração das células, que podia ser visualizada até 3 dias após a adição.

Essa agregação entre as células recombinantes após a adição do antibiótico pode estar associada a um mecanismo de proteção das células contra o antibiótico ou a algum efeito físico-químico que ocorre no cultivo após a adição do fármaco, devido a sua carga ou alguma característica própria do composto. Esses aglomerados celulares podem influenciar a homogeneidade do cultivo, podem promover algumas flutuações no procedimento de contagem e podem comprometer a viabilidade celular devido a possibilidade de ocorrência de morte celular por carência nutricional no interior dos mesmos.

A Figura 34 demonstra esse fenômeno através de fotografia convencional das células aderidas ao frasco T em microscópio óptico convencional e a Figura 6 apresentada na seção 3.5 também apresentou um aglomerado celular visualizado em hematócrito durante o procedimento de contagem.

Figura 34: Formação de aglomerados celulares após a adição do antibiótico higromicina B para seleção de células recombinantes em microscópio óptico convencional com aumento de 40x na lente objetiva e 10x na lente ocular.



Fonte: Fotografia das células S2MtRVGP-H-His em cultivo nos frascos T. O antibiótico higromicina (*Hygromycin B*) é referenciado na imagem como Hy. Acervo pessoal.

## 5.2 Estudo em larga escala para maximização da expressão da glicoproteína rRVGP em biorreator com agitação induzida por ondas (*Waves*).

Para facilitar as comparações com os seis experimentos executados anteriormente, o primeiro experimento em larga escala no biorreator com agitação induzida por ondas ou simplesmente biorreator *Wave* foi denominado Experimento 7 e foi realizado em fevereiro de 2016. Com o objetivo de obtermos uma duplicata do Experimento 7, foi realizado um experimento em junho de 2016, o qual foi chamado de Experimento 8. A Tabela 15 abaixo apresenta todos os parâmetros e as condições experimentais no biorreator *Wave* nos Experimentos 7 e 8.

**Tabela 15: Condições experimentais utilizadas no biorreator *Wave* nos Experimentos 7 e 8.**

Parâmetros iniciais	Valores
Temperatura	28°C
Agitação (velocidade e ângulo)	20 rpm/8°
Saturação de ar (monitoramento)	80%
pH	6,25
Densidade do inóculo	$5 \times 10^5$ cel.mL <sup>-1</sup> $3,3 \times 10^8$ células viáveis
Volume final do biorreator	650 mL na bag de 1L de volume de trabalho
Duração do cultivo	120h

A duração do cultivo foi fixada em função do fato de que a proteína recombinante produzida no cultivo deve ser colhida na fase do cultivo em que sua concentração é alta e ainda apresenta integridade e qualidade, situação que normalmente se apresenta no final da fase exponencial quando os nutrientes atingem concentrações baixas. Porém, devido a indução com CuSO<sub>4</sub> a partir das 72 h o comportamento exponencial do crescimento se torna difícil de ser identificado devido ao incremento substancial da síntese de proteínas

por causa da modificação genética a que a célula foi submetida. A indução com  $\text{CuSO}_4$  depois das 72 h implica no risco de se chegar em uma fase de expressão de rRVGP com depleção de alguns aminoácidos, situação que conduz a uma formação deficiente da glicoproteína. Trabalhos anteriores mostraram que nessas condições a proteína produzida além de ficar inativa é facilmente degradada por mecanismos de controle da própria célula (SWIECH *et al.* 2007, 2008). Além disso, estudos iniciais realizados no LIV do Instituto Butantan têm demonstrado que em fases avançadas do cultivo, a rRVGP na conformação trimérica começa a diminuir em solução e como a integridade e qualidade da proteína produzida são essenciais para a purificação e caracterização pós-cultivo, determinou-se que o experimento fosse interrompido antes da entrada na fase estacionária. Dessa forma, na tentativa de garantir a coleta da proteína recombinante no final da fase de crescimento, o experimento foi interrompido nas 120 h de cultivo.

A escolha dos parâmetros de agitação e angulação do biorreator foi feita através de levantamento de literatura e o valor exato foi particularmente escolhido devido à semelhança com os experimentos de Wang *et al.* (2012), que realizaram experimentos para a produção de anticorpos monoclonais com o mesmo biorreator e com o mesmo sistema de expressão, *Drosophila melanogaster* S2, também obtida pela transfecção estável.

Sendo assim, a Figura 35 apresenta os resultados do primeiro experimento em larga escala, Experimento 7, e a Figura 36 apresenta o segundo experimento em larga escala, Experimento 8 (replicata).

Figura 35: Resultados do primeiro experimento de cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave*, com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1 L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°C, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 65%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.

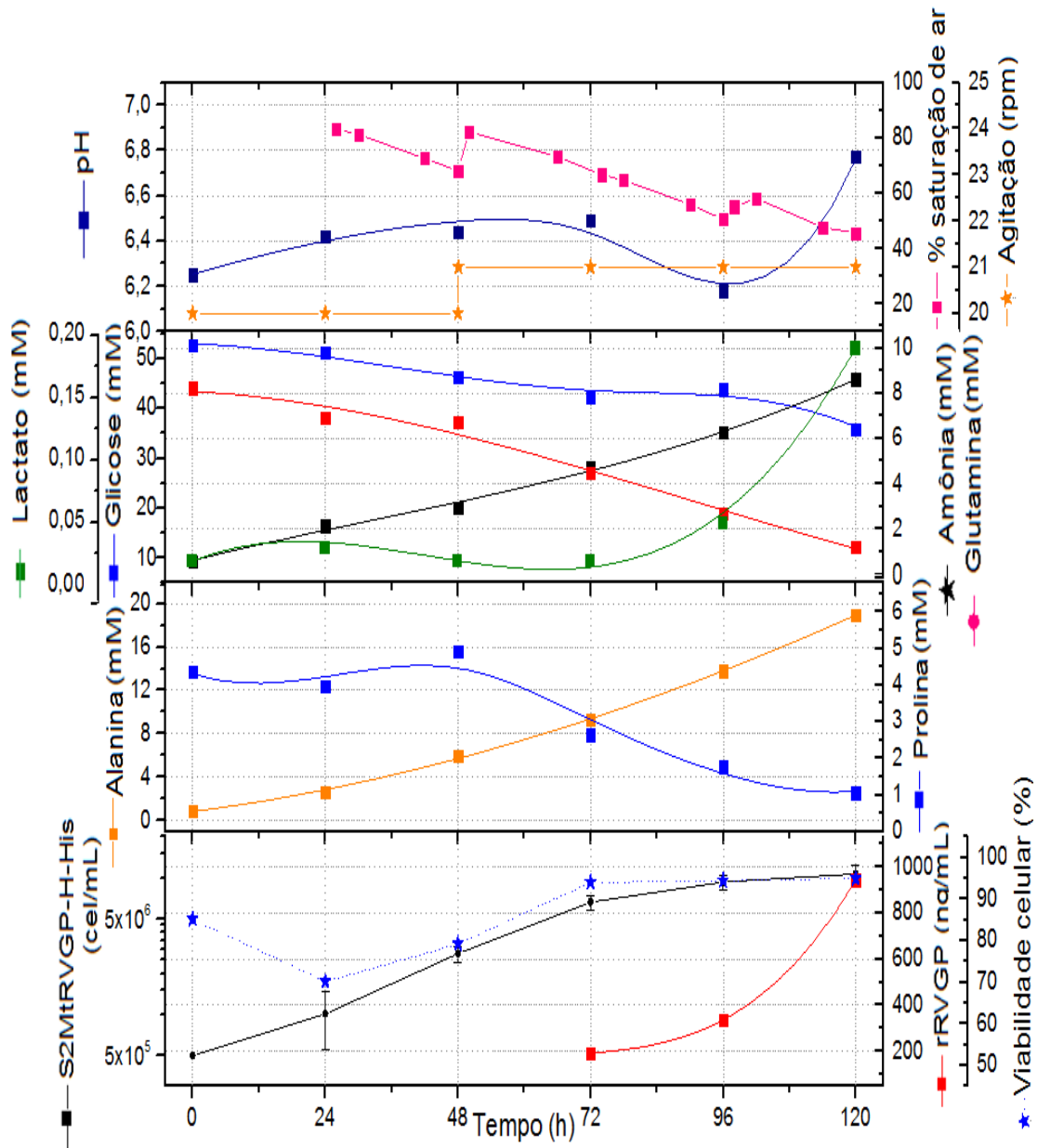
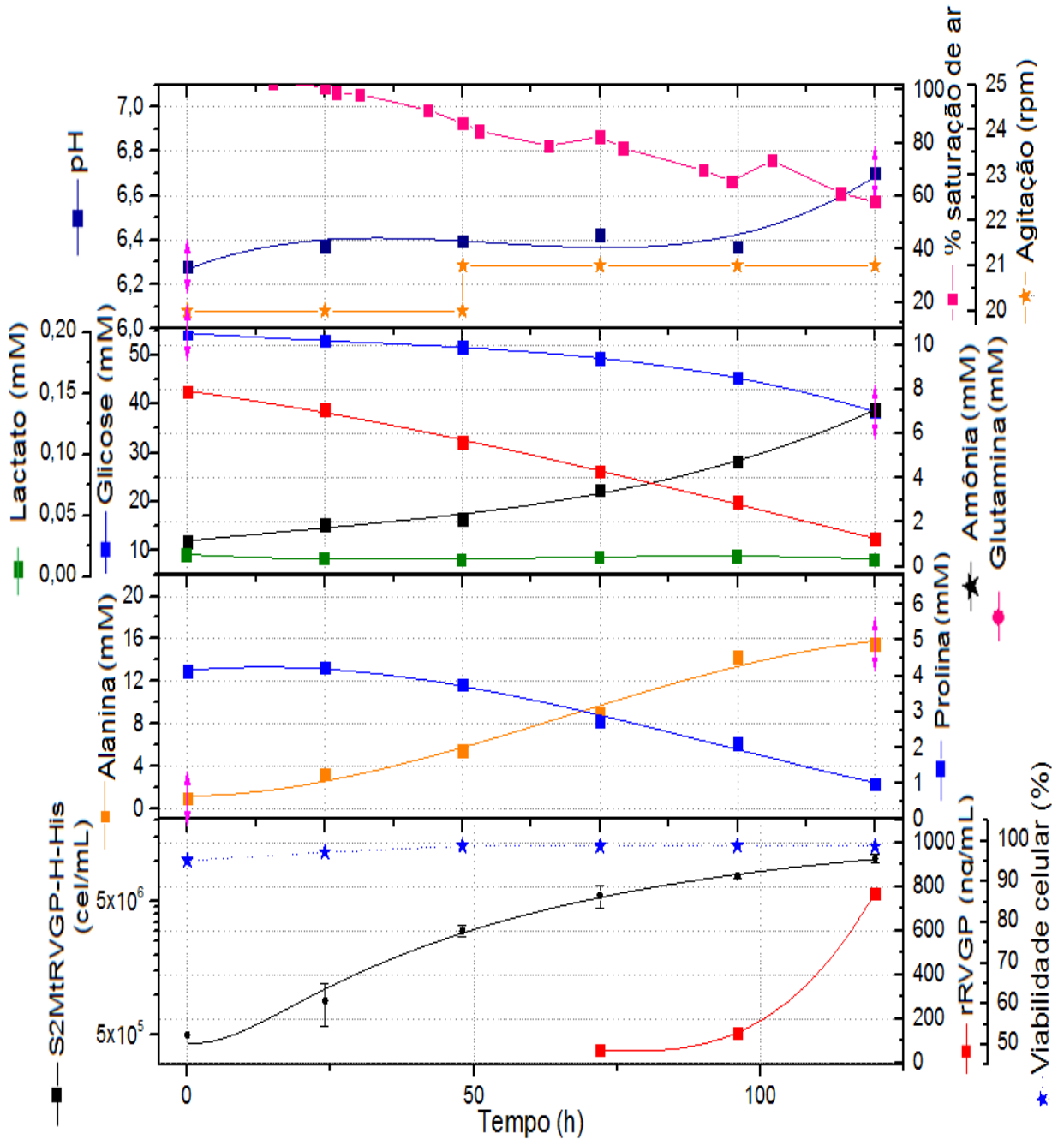




Figura 36: Resultados do segundo experimento de cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave* com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1 L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°C, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 80%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.



Os Experimentos 7 e 8 apresentaram curvas de crescimento exponencial seguido de uma fase de desaceleração e de uma fase estacionária. A saída da fase exponencial aparentemente foi provocada pela indução da expressão da proteína recombinante a partir das 72 h já que não se detectou esgotamento de nutrientes. O crescimento celular dos dois experimentos não apresentou diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$  - Teste-t descrito no item 5.3). O Experimento 7 apresentou  $X_{\text{máx}}$  de  $1,07 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,036 \text{ h}^{-1} \pm 0,0016$ ,  $R^2 = 0,993$  e o Experimento 8 apresentou  $X_{\text{máx}}$  de  $1,04 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,035 \text{ h}^{-1} \pm 0,0036$ ,  $R^2 = 0,968$ . A produção da glicoproteína não apresentou diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$  - Teste-t descrito no item 5.3). O experimento 7 apresentou produção máxima da rRVGP de  $942,79 \text{ ng.mL}^{-1}$ , produção máxima específica de  $7,49 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g.cel}^{-1}\text{mL}^{-1}$  e produção total no biorreator de  $0,487 \text{ mg}$  de rRVGP. O Experimento 8 apresentou produção máxima da rRVGP de  $770,94 \text{ ng.mL}^{-1}$ , produção máxima específica de  $7,89 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{g.cel}^{-1}\text{mL}^{-1}$  e produção total no biorreator de  $0,462 \text{ mg}$  de rRVGP.

O pH do Experimento 7 variou de 6,25 até 6,77 e o do Experimento 8 de 6,28 até 6,70 demonstrando, portanto, comportamento semelhante aos experimentos em pequena escala. No entanto, 24 h após a indução com  $\text{CuSO}_4$  (72 h), o pH verificado caiu para 6,18 no Experimento 7 e 6,36 no Experimento 8 e após 48 h da indução, aumentou para 6,77 no Experimento 7 e 6,70 no Experimento 8. Essa queda e retomada observada em ambos os experimentos está provavelmente relacionada ao momento da indução, pois já foi observado em outros experimentos que ocorre uma queda do pH imediatamente após a adição de  $\text{CuSO}_4$ , seguido do retorno aos valores pré-indução.

Nos experimentos em pequena escala também foi visto essa queda imediatamente após a adição de  $\text{CuSO}_4$ , porém quando se media o pH 24 h pós indução, o valor já estava normalizado para aquele momento do cultivo (entre 6,5 – 6,6) e por isso não se conseguiu identificar essa queda nos gráficos dos Experimentos 1, 2 e 3. Já nos experimentos em larga escala o pH levou um pouco mais de tempo para se normalizar pós-indução, o que justifica a queda vista nos gráficos dos Experimentos 7 e 8. No entanto o valor de pH alcançou um valor conveniente no final de ambos os experimentos, concluindo o Experimento 7 com 6,77 e o Experimento 8 com 6,70, valores mais próximos do valor ótimo de 7,2 da rRVGP. Vale ressaltar que após o término de ambos os experimentos, as amostras de células retiradas foram congeladas com tampão em pH 7,2 para preservar a integridade estrutural da rRVGP produzida.

A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada durante ambos os experimentos e foi verificada que variou durante o cultivo. No Experimento 7 variou de 83,3 a 45,6% e a do Experimento 8 de 100 a 57,9%. As possíveis razões dessa variação da concentração de oxigênio dissolvido podem ser atribuídas ao aumento da densidade celular e a entrada de ar na *Cellbag* durante o procedimento de amostragem.

O consumo de glicose durante às 120 h de cultivo em biorreator foi considerado baixo frente à disponibilidade desse nutriente no meio de cultura Sf-900 III. No Experimento 7 havia inicialmente 52,6 mmol/L de glicose dos quais foram consumidos 17,1 mmol/L, restando portanto ao final do cultivo 35,8 mmol/L. No Experimento 8 havia inicialmente 54,5 mmol/L os quais foram consumidos 16,2 mmol/L, restando portanto ao final do cultivo 38,3 mmol/L. Dessa forma, juntamente com a análise dos aminoácidos modificados no meio Sf-900 II para o Sf-900 III evidenciados na seção de resultados 5.1.1 concluímos que o meio Sf-900 III tem uma composição mais equilibrada de aminoácidos, visto que em nenhum momento do presente trabalho foi necessária suplementação. No entanto, a quantidade de glicose disponível no meio precisa ser melhorada visto o desperdício desse nutriente ao final do cultivo, que quando escalonamos para um processo industrial, torna-se um grande problema devido ao custo associado à perda desse carboidrato e aos problemas de tratamento de resíduos industriais gerados pelo bioprocessamento.

Os valores de lactato produzidos nos Experimentos 7 e 8 foram muito baixos. No Experimento 7 oscilou de 0,002 à 0,01 g/L e no Experimento 8 de 0,001 à 0,002 g/L. Esse fator corrobora com os experimentos em biorreator de Swiech *et al.* (2007, 2008), que observou a produção de lactato foi muito baixa, atingindo concentrações máximas de 0,057 g/L. Esses valores são muito inferiores aos valores relacionados à inibição de crescimento celular, o que nos permite concluir que a produção de lactato não é um fator preocupante para o cultivo de células S2 visando a produção da rRVGP.

O consumo de glutamina foi considerado elevado em ambos os cultivos. No experimento 7 havia inicialmente 8,2 mmol/L e ao final do cultivo havia apenas 1,2 mmol/L e no Experimento 8 havia inicialmente 7,8 mmol/L e ao final do cultivo havia apenas 1,2 mmol/L. Esse fator está de acordo com a evidência de a glutamina ser o segundo maior componente nos meios de cultura e atuar como fonte de carbono e energia. No entanto, como resultado do metabolismo da glutamina, há geração de íons amônio no cultivo celular. No caso de cultivos de células de inseto a produção de amônio é bem

maior que a de células de mamíferos (BORASH *et al.*, 2000). A produção de amônia no Experimento 7 alcançou 45,8 mmol/L e no Experimento 8 alcançou 38,7 mmol/L. No entanto como evidenciado nos experimentos de pequena escala, a *Drosophila melanogaster* é reconhecida pela elevada tolerância à componentes tóxicos, como a amônia (BORASH *et al.*, 2000) e os valores do presente trabalho também corroboram com o experimento em biorreator *Bioflo110* de Swiech *et al.* (2007, 2008), que chegou a atingir 62 mM de amônia. Desse modo concluímos que essa elevada produção de amônia não é um fator preocupante para o cultivo de células S2 visando a produção da rRVGP.

Os aminoácidos considerados críticos nos Experimentos 7 e 8, ou seja, aqueles que alcançaram mais de 80% de consumo foram apenas a glutamina e a prolina. Este é um aminoácido muito utilizado no metabolismo dos insetos e é considerado o principal substrato energético muscular para o vôo (SCARAFFIA *et al.*, 2003). No Experimento 7 havia inicialmente 4,3 mmol/L de prolina e ao final do cultivo havia apenas 1,0 mmol/L. No Experimento 8 havia inicialmente 4,1 mmol/L e ao final do cultivo havia apenas 0,98 mmol/L.

O aminoácido alanina é frequentemente observado em quantidades elevadas em meios de cultura que possuem concentração elevada de glicose (BHATIA *et al.*, 1997), como é o caso dos meios Sf-900 II e III, que possuem concentração de 10 g/L de glicose. Além disso, como explicado na seção 3.5.3.4, grande parte da amônia produzida é incorporada na alanina, o que provoca aumentos consideráveis desse aminoácido. Os valores máximos observados nos Experimento 7 e 8 foram 18,96 mmol/L e 15,53 mmol/L, respectivamente.

Uma análise muito interessante visando o estudo comparativo entre dois bioprocessos desenvolvidos com a mesma linhagem e o mesmo meio de cultura, apenas utilizando biorreatores diferentes é evidenciada na Tabela 16 abaixo. O trabalho corresponde aos estudos de Ventini *et al.* (2014), desenvolvido no LIV-Instituto Butantan.

**Tabela 16: Dados comparativos de produção da rRVGP com células S2MtRVGP-H-His em biorreator *Wave* e *Bioflo* 110.**

	<b>Ventini <i>et al.</i> (2014)</b>	<b>Presente trabalho</b>
Célula S2 recombinante	S2MtRVGP- H- His	S2MtRVGP- H- His
Inóculo	$5 \times 10^5$ cel.mL <sup>-1</sup>	$5 \times 10^5$ cel.mL <sup>-1</sup>
Biorreator	<i>Bioflo</i> 110	<i>Wave</i> 2/10
Volume de trabalho	1L	650 mL
Temperatura	28°C	28°C
Agitação	90 rpm	20 rpm/8°C de ângulo até 96h e 21 rpm/9°C de ângulo até 120h
Saturação de ar	Controle: 10% de ar, Vazão: 0,1 L/min	Monitoramento: inicial próxima de 80% de saturação de ar com oscilação abaixo
Indução da expressão da rRVGP	Acima de $5 \times 10^6$ cel.mL <sup>-1</sup> (48h)	Acima de $6,6 \times 10^6$ cel.mL <sup>-1</sup> (72h)
Densidade celular máxima alcançada	$1,8 \times 10^7$ cel.mL <sup>-1</sup>	$1,1 \times 10^7$ cel.mL <sup>-1</sup>
Produção máxima de rRVGP	1,09 µg/mL	0,85 µg/mL
Produção máxima específica (por célula) de RVGP	$6,06 \times 10^{-8}$ µg/cel×mL	$7,69 \times 10^{-8}$ µg/cel×mL
Produção total do reator	1 mg (1 L volume de trabalho)	0,47 mg (650 mL de volume de trabalho)

Fonte: VENTINI et al., 2010, 2014.

A densidade celular máxima alcançada no presente trabalho foi inferior quando comparada com os resultados obtido nos estudos de Ventini *et al.* (2014),  $1,1 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> (média dos Experimentos 7 e 8) e  $1,8 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, esse fato não permitiu que a produtividade de rRVGP por célula fosse menor. Cálculos realizados com os dados de Ventini et al. (2014) e do presente trabalho mostram que a produtividade específica foi de  $6,06 \times 10^{-8}$  µg.cel<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> para Ventini *et al.* (2014) e  $7,69 \times 10^{-8}$  µg.cel<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> no presente trabalho.

Fazendo uma análise da cinética geral dos resultados obtidos neste trabalho percebe-se que para desenvolvimento do cultivo de S2 sob indução da expressão de rRVGP, recursos celulares são direcionados para a produção da glicoproteína, o que afeta a velocidade de crescimento celular. Este comportamento é coerente com o relatado na literatura para linhagens celulares recombinantes, particularmente as linhagens

transfectadas como a do presente trabalho, de forma que, se o crescimento da linhagem celular for muito intenso, a produção de proteína recombinante será prejudicada (BARNES *et al.*, 2001; HAYTER *et al.*, 1992). Esta constatação experimental sugere uma nova perspectiva de estudo sobre a forma de operação do biorreator, com uma primeira etapa em que se priorize o crescimento celular e uma segunda etapa em que, depois da indução com  $\text{CuSO}_4$ , se objetive preferencialmente a biossíntese da rRVGP com alimentação equilibrada de nutrientes em forma de batelada alimentada.

Além disso, a análise comparativa desses dos biorreatores coloca em evidência a robustez das células S2 para ser utilizada em bioprocessos com diferentes equipamentos mantendo valores dentro de uma faixa reprodutível de produção da rRVGP. Esta característica confirma o potencial do biorreator *Wave* como uma alternativa eficiente, moderna e econômica quando comparado com modelos que representam a tecnologia convencional, como é o caso do biorreator tanque agitado *Bioflo* utilizado por Ventini *et al.* (2014).

### **5.3 Análise da reprodutibilidade de cultivos em larga escala e da viabilidade do escalonamento.**

Os cultivos de células animais para produção de biofármacos, biomoléculas ou mesmo para produção de células como produto, demandam extremo rigor no monitoramento e controle de parâmetros de processo como pH, temperatura, agitação e concentração de gases dissolvidos ( $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ ). Para garantir tal exigência grandes avanços tecnológicos têm sido conseguidos nos últimos 15 anos refletindo-se na implementação de novos conceitos de biorreatores e da instrumentação auxiliar utilizada no monitoramento e controle dos cultivos de células.

No âmbito da Engenharia de Bioprocessos é muito conhecido o fato de que os processos biológicos apresentam uma reprodutibilidade baixa em função dos múltiplos fatores que afetam o crescimento celular e a biossíntese de um produto. No presente caso, alguns fatores adicionais podem dificultar a reprodução dos cultivos merecendo, portanto, alguns comentários que deverão auxiliar na melhor compreensão dos experimentos no biorreator *Wave* realizados com replicata. Entre os fatores mais relevantes podem-se citar: a) quantificação da expressão da rRVGP pelo teste de ELISA, que por ser uma metodologia baseada em interações imunoquímicas em uma mistura extremamente complexa de proteínas, pode apresentar erros de até 20%.

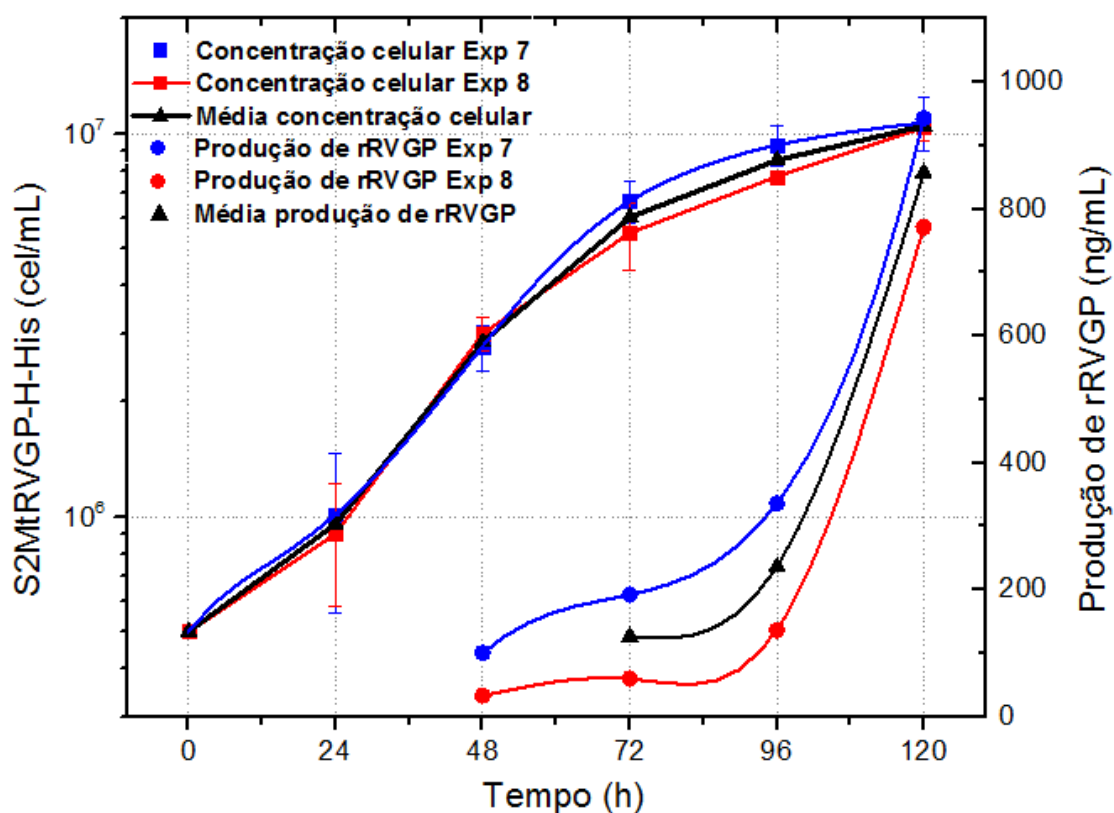
b) A formação de aglomerados celulares que podem introduzir erros consideráveis no procedimento de contagem de células, além de provocar morte celular no interior dos mesmos.

c) A dificuldade intrínseca de extração da rRVGP, que por ser uma proteína transmembrana necessita de digestão da membrana plasmática com detergentes fortes para isolamento da mesma. Esse tratamento pode modificar a estrutura terciária da rRVGP e provocar erro na quantificação pelo ELISA.

d) O biorreator *Wave 2/10*, por ser o modelo mais básico do fabricante GE Healthcare, não é fornecido com controlador de oxigênio dissolvido. Por esta razão a realização de experimentos com replicata torna-se mais difícil, uma vez que não é possível reproduzir com exatidão o histórico da oxigenação do cultivo.

A Figura 37 a seguir apresenta os resultados obtidos nos experimentos em replicata (Experimento 7 e 8) de cultivo em larga escala da rRVGP, bem como a média calculada das densidades celulares e da concentração de rRVGP para análise da reprodutibilidade dos cultivos em biorreator *Wave*.

**Figura 37: Resultado dos dois experimentos de cultivo em biorreator *Wave* para produção de rRVGP.**



O Experimento 7 apresentou  $X_{\text{máx}}$  de  $1,07 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,036 \text{ h}^{-1} \pm 0,0016$ ,  $R^2 = 0,993$  e o Experimento 8 apresentou e  $X_{\text{máx}}$  de  $1,04 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,035 \text{ h}^{-1} \pm 0,0036$ ,  $R^2 = 0,968$ . Analisando os valores de crescimento celular de cada experimento ponto a ponto ao longo do tempo, evidenciam-se na Tabela 17 a seguir, os seguintes resultados:

**Tabela 17: Análise do crescimento celular ao longo do tempo nos Experimentos 7 e 8**

h	Concentração celular Experimento 7 (cel mL <sup>-1</sup> )	Concentração celular Experimento 8 (cel mL <sup>-1</sup> )	Valor de p Teste-T
0	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	---
24	$1,01 \times 10^6$	$9 \times 10^5$	0,701
48	$2,7 \times 10^6$	$3,01 \times 10^6$	0,392
72	$6,60 \times 10^6$	$5,50 \times 10^6$	0,143
96	$9,33 \times 10^6$	$7,73 \times 10^6$	0,067
120	$1,07 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7$	0,758

Dessa forma, analisando as concentrações celulares ponto a ponto, 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h evidenciam-se que não existem diferenças significativas de crescimento celular entre os Experimentos 7 e 8 ( $p > 0,05$  - Teste-t).

Em relação à produção de rRVGP, o experimento 7 apresentou produção máxima da rRVGP de  $942,79 \text{ ng.mL}^{-1}$ , produção máxima específica de  $7,49 \times 10^{-5} \mu\text{g.cel}^{-1}\text{mL}^{-1}$  e produção total no biorreator de  $0,48 \text{ mg}$  de rRVGP e o Experimento 8 apresentou produção máxima da rRVGP de  $770,94 \text{ ng.mL}^{-1}$ , produção máxima específica de  $7,89 \times 10^{-5} \mu\text{g.cel}^{-1}\text{mL}^{-1}$  e produção total no biorreator de  $0,46 \text{ mg}$  de rRVGP. Analisando os valores produzidos nos dois experimentos, evidencia-se que não existem diferenças significativas de produção de rRVGP ( $p\text{-valor} = 0,7539$ , portanto  $p > 0,05$  - Teste t)

Dessa forma, com base nas análises de concentração celular e produção de rRVGP verifica-se que a produção da glicoproteína recombinante do vírus da raiva em biorreator *Wave* seguindo as condições apresentadas nesse trabalho, apresenta uma elevada reprodutibilidade.

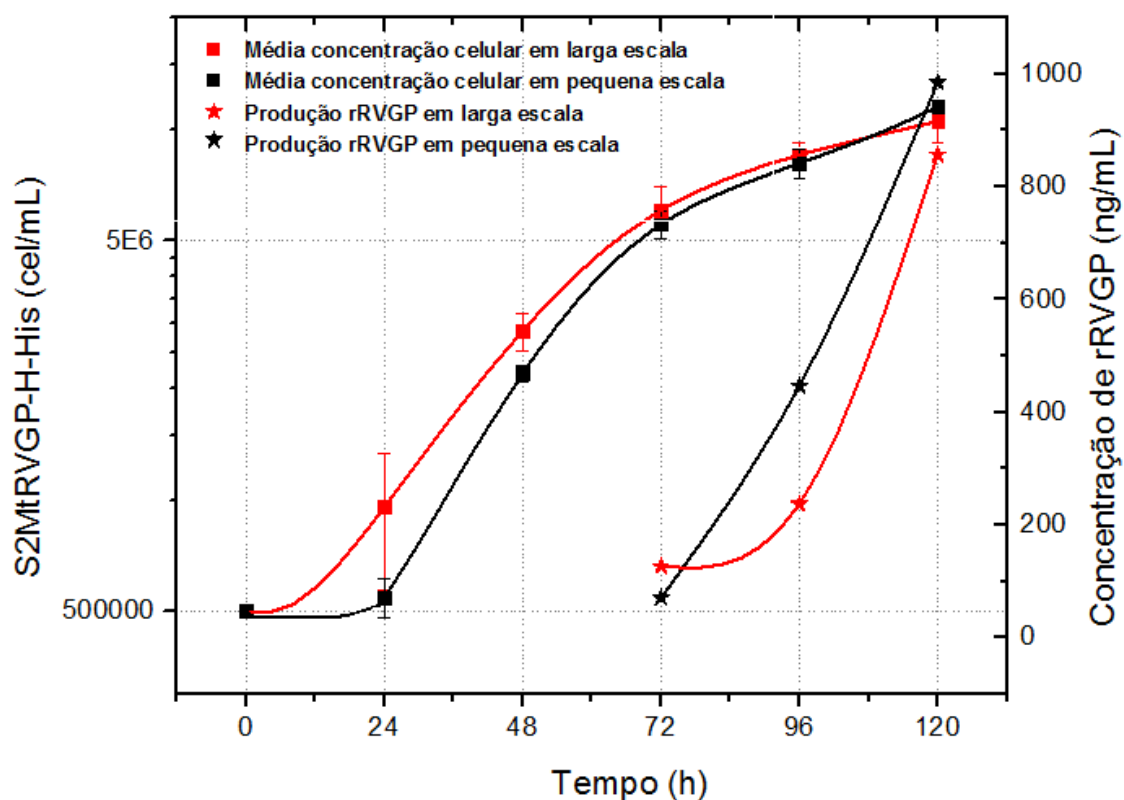
Por fim, com o objetivo de comparar o processo de cultivo em pequena escala e larga escala, foi realizada uma análise dos experimentos realizados nas mesmas condições: temperatura de  $28^\circ\text{C}$ ; indução da expressão em 72 h; meio de cultura Sf900-III; linhagem S2MtRVGP-H-His e inóculo de  $5 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$ . A única diferença dentre os



experimentos é o volume de trabalho, os quais corresponderam a 20 mL para os experimentos de pequena escala em frascos Schott e 650 mL para os experimentos de larga escala em biorreator *Wave*.

A Figura 38 apresenta os resultados dos experimentos realizados. Para sua construção foi calculada uma média dos valores obtidos e o desvio padrão para experimentos realizados em triplicata para a pequena escala e em duplicata para a larga escala.

Figura 38: Análise comparativa de crescimento celular e produção de rRVGP nos experimentos de cultivo de células S2MtRVGP-H-His em pequena (frasco Schott,  $V_{\text{final}}=20$  mL) e larga escala (biorreator *Wave*,  $V_{\text{final}}=650$  mL).



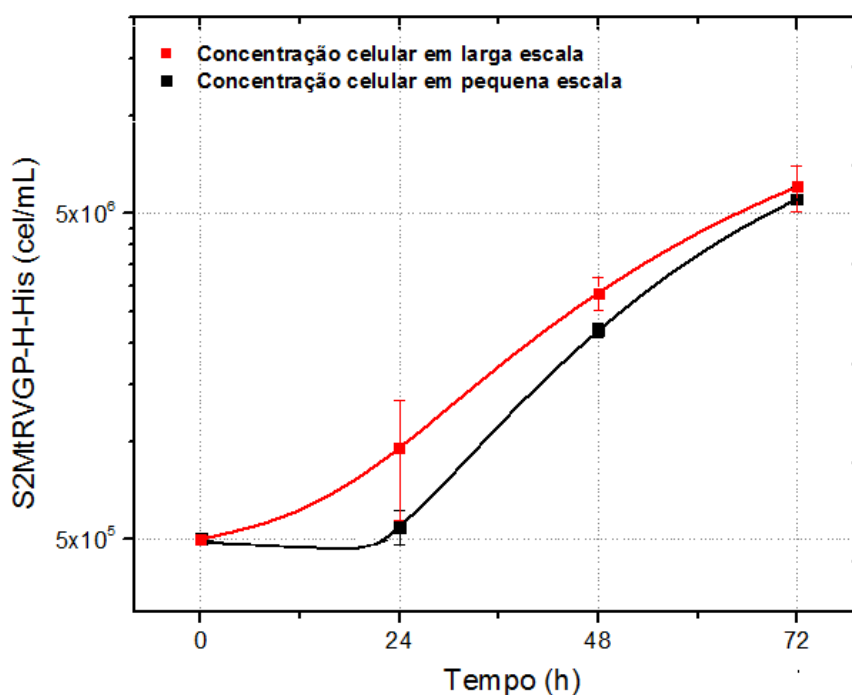
A densidade celular máxima obtida na 120 h foi  $X_{\text{máx}} 1,05 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> no cultivo em larga escala e  $X_{\text{máx}} 1,15 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> no cultivo em pequena escala. A Tabela 18 a seguir evidencia os resultados de análise comparativa de crescimento celular ponto a ponto ao longo do tempo.

**Tabela 18: Análise do crescimento celular ao longo do tempo nos experimentos de pequena e larga escala.**

h	Concentração celular média em larga escala (cel mL <sup>-1</sup> )	Concentração celular média em pequena escala (cel mL <sup>-1</sup> )	Valor de p Teste-T
0	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	---
24	$9,55 \times 10^5$	$5,46 \times 10^5$	0,067
48	$2,86 \times 10^6$	$2,19 \times 10^6$	0,039
72	$6,05 \times 10^6$	$5,54 \times 10^6$	0,529
96	$8,53 \times 10^6$	$8,10 \times 10^6$	0,691
120	$1,05 \times 10^7$	$1,15 \times 10^7$	0,267

Dessa forma, o crescimento celular ao longo do tempo entre os experimentos de pequena e larga escala não apresentaram diferenças significativas, exceto no ponto 48 h ( $p > 0,05$  - teste-t para os pontos 24 h, 72 h, 96 h e 120 h e  $p < 0,05$  para o ponto 48 h). Com isso, através de uma análise mais detalhada da curva de crescimento celular podemos observar a Figura 39, que apresenta uma análise dos resultados das curvas nos intervalos iniciais de cultivo.

Figura 39: Comparação do crescimento celular nas primeiras 72 horas de cultivo em frascos Schott e biorreator *Wave*.



Uma análise da Figura 39, em especial do trecho de 0 a 48 h, mostra uma menor semelhança no comportamento dos cultivos em diferentes escalas. Em 24 h não houve diferença significativa ( $p = 0,067$ , portanto  $p > 0,05$  - Teste-t) provavelmente devido ao desvio padrão associado. No entanto, em 48 h houve diferença significativa ( $p = 0,039$ , portanto  $p < 0,05$  - Teste-t). Essa diferença também foi observada durante os experimentos em frascos Schott, de forma que as células de *Drosophila melanogaster* S2 por serem semi-aderentes, podem ser facilmente adaptadas à cultivos em suspensão. Com frequência observou-se que quando as células da fase aderente em frascos T eram passadas para a fase suspensa em frascos Schott, notava-se a existência de uma fase lag no início do cultivo, o que não ocorria quando as células suspensas de frasco Schott eram passadas para continuarem suspensas em biorreator *Wave*. Dessa forma, o estudo confirmou as evidências laboratoriais de que a linhagens S2 apresenta uma pequena fase lag quando é adaptada à forma suspensa a partir de sua fase aderente.

Em termos industriais essa evidência se reveste de grande importância, visto que uma fase lag no início do cultivo em um processo industrial pode implicar em prejuízos econômicos por causa de tempos mortos ou improdutivos. Esse problema pode ser resolvido facilmente mediante o preparo de um pré-inóculo com as células S2MtRVGP-H-His em suspensão para que posteriormente sejam inoculadas no biorreator industrial.

Em relação as concentrações de glicoproteína, a produção máxima do cultivo em larga escala foi 856,86 ng/mL e do cultivo em pequena escala foi 984,96 ng/mL. Esses resultados não apresentaram diferenças significativas ( $p = 0,816$ , portanto  $p > 0,05$  - Teste-t).

Dessa forma, com a análise do escalonamento de uma maneira global, ficou evidente que durante o desenvolvimento dos experimentos em pequena para a larga escala não ocorreram diferenças significativas de crescimento celular e produção de rRVGP. Além disso, o processo não gerou grandes dificuldades e apresentou um aumento de escala favorável, gerando, portanto, uma boa perspectiva de escalonamento.

## 6 CONCLUSÃO

As conclusões sobre a pesquisa realizada são as seguintes:

a) A análise da influência da temperatura nos valores de 22, 25 e 28 °C para produção de rRVGP pela linhagem S2MtRVGP-H-His cultivada em frascos Schott revelou que a mais alta é a mais apropriada para essa finalidade.

b) O estudo da influência do tempo de indução com CuSO<sub>4</sub> com valores de 0, 24, 48 e 72 horas na expressão de rRVGP acumulada no cultivo da célula S2MtRVGP-H-His mostrou que o tempo ideal para maximizar a expressão é o de 72 horas.

c) A comparação das características de crescimento celular entre a célula selvagem e a recombinante mostrou cinéticas diferentes, mesmo na ausência de indução com CuSO<sub>4</sub>. No entanto as células S2MtRVGP-H-His, quando ativadas com CuSO<sub>4</sub>, demonstraram satisfatórios resultados de crescimento celular e produção de rRVGP. Esse perfil de comportamento leva a crer que a modificação genética não gerou alterações prejudiciais à fisiologia celular da célula S2.

d) Foram encontrados poucos dados na literatura sobre a utilização do meio de cultura Sf-900 III, um meio de cultura desenvolvido, a princípio, para cultivo de células de *Spodoptera frugiperda*. No entanto, foi demonstrada neste trabalho a capacidade para ser utilizado no cultivo de células *Drosophila melanogaster* S2, uma vez que foi capaz de propiciar boas condições para a expansão celular e produção da rRVGP. Porém, percebeu-se que a concentração de glicose está em níveis muito elevados.

e) Em relação à produção da rRVGP em larga escala utilizando o biorreator *Wave* como alternativa moderna e econômica com relação aos equipamentos convencionais, como o biorreator de tanque agitado, demonstrou-se a viabilidade de um processo de cultivo de boa reprodutibilidade e com grande potencial de escalonamento.

## 7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Analisar o perfil de glicosilação das glicoproteínas produzidas para comparar com outros sistemas de expressão.
2. Realizar experimentos com controle de oxigênio dissolvido para verificar uma possível influência na eficiência do bioprocessamento, seja em termos de rendimento, seja em termos de qualidade da rRVGP.
3. Realizar estudos de transferência de oxigênio em biorreator *Wave*.
4. Realizar experimentos no modo batelada alimentada no biorreator *Wave* com o intuito de estender mais a fase de indução com  $\text{CuSO}_4$  e aumentar as possibilidades de acúmulo de maiores quantidades de rRVGP.
5. Dar continuidade aos estudos de escalonamento de cultivos no biorreator *Wave* numa etapa de operação com a *Cellbag* de 3L.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª Edição. Porto Alegre. **Artmed**, 2004.

ASHRAF, S.; SINGH, P.; YADAV, D.; 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.; VENTINI, D.; BOLDORINI, V.; et al. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. **Vaccine**. v.32, p.2829-2832, 2014.

ASTRAY, R.; JORGE, S.; LEMOS, M.; YOKOMIZO, A.; BOLDORINI, V. Kinetic studies of recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) cDNA transcription and mRNA translation in *Drosophila melanogaster* S2 cell populations. **Citotechnology**.v.65, p.829-838, 2013.

ATCC., American Type Culture Collection. ATCC Organization. Disponível em [http://www.atcc.org/en/About/About\\_ATCC/Who\\_We\\_Are.aspx](http://www.atcc.org/en/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx). Visualizado em 20/08/2015.

BARNES, L.; BENTLEY, C.; DICKSON, A. Characterization of the Stability of Recombinant Protein Production in the GS-NS0 Expression System. **Biotechnology and Bioengineering**.v.73, no4, p.261-270, 2001.

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

BORASH, D.; PIERCE, V.; GIBBS, A.; MUELLER, L. Evolution of ammonia and urea tolerance in *Drosophila melanogaster*: resistance and cross-tolerance. **Journal of Insect Physiology**.v.46 (5), p.763-769, 2000.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Applied Microbiology and Biotechnology**.v.68, p.283-291, 2005.

CHA, H. J.; SHIN,H.; LIM,H.; 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.

CLEMENTS, D.; COLLIER, B.; OGATA, S.; et al. Development of a Recombinant Tetravalent Dengue Virus Vaccine: Immunogenicity and Efficacy Studies in Mice and Monkeys. **Vaccine**. v28, p.2705-2715, 2010.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; GREGORIO, E. Vaccines for the 21st Century. **EMBO Molecular Medicine**.v.6, p.708-720, 2014.

DETTZBAUGH, M. Genetically Engineered Vaccines: An Overview. **Plasmid**.v.39, p.100-113, 1998.

DRINGS, A.; JALLET, C.; CHAMBERT, B.; TORDO, N.; PERRIN, P. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? **Vaccine**.v.17, p1549-1557, 1999.

FENGE. C.; LULLAU, E. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies. Edited by Ozturk,S E Hu,W. 1<sup>st</sup> Edition. **Taylor&Francis Group**.p.155-224, 2006.

FRESHNEY, R. Culture of Animal Cells. A manual of basic technique and specialized applications.6<sup>a</sup> Edition.**Wiley-BlackWell**, 2010.

FRIES, S.; GLAZOMITSKY, K.; WOODS, A.; et al. Evaluation of Disposable Bioreactors. Rapid Production of Recombinant Proteins by Several Animal Cell Lines. **BioProcess International**. p.36-44, 2005.

GAO, M.; LI,Y.; XUE,X.; WANG,X.; LONG,J. Stable Plastid Transformation for High-Level Recombinant Protein Expression: Promises and Challenges. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. v.2012. p.158-232, 2012.

GAUDIN, Y.; ROCHE, S. Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimmers. **Journal of Virology**.v.297, p128-135, 2002.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R.; TUFFEREAU, C.; KONOSSOW, M.; FLAMAND A. Rabies virus glycoprotein. **Virology**.v.187(2), p.627-632, 1992.

GE HEALTHCARE. *Wave* Bioteactor™ 2/10 and 20/50 systems. Operating Instructions. Disponível em [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc28964123\\_20141229011116.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc28964123_20141229011116.pdf). Acesso em 23/11/2015.

GÒDIA, F.; CAIRO, J. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies. Edited by Ozturk,S E Hu,W. 1<sup>st</sup> Edition. **Taylor&Francis Group**.p.81-112, 2006.

GRIFFITHS, J. B. Animal cell products, overview. **Encyclopedia of Cell Technology**.v.1, p.71-76, 2000.

GRONEMEYER, P.; DITZ, R.; STRUBE J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing.**Bioengineering**.v.1, p.188-212, 2014.

HEINRIKSON, S.; MEREDITH, S. Amino Acid Analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. **Biochemistry**. v.136,p. 65-74, 1984.

HICKS, D. J.; FOOKS, A.; JOHNSON, N. Developments in rabies vaccines. **Clinical and Experimental Immunology**.v.169, p.199-204, 2012.

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

INVITROGEN. User Guide *Drosophila Schneider 2 (S2) Cells* by **Thermo Fisher Scientific**. Catalog Number R690-07, Document Part Number 28-0172, 2015.

KING, A.; ADAMS, M.; CARSTENS, E.; LEFKOWITZ, E. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Waltham, MA: Elsevier, 2011.

KOSER, M.; MCGETTIGAN, J.; TAN, G.; et al. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 25, p. 9405–9410, 2004.

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

LEMOS, M.; SANTOS, A.; ASTRAY, R.; PEREIRA, C.; JORGE, S. Rabies virus glycoprotein in *Drosophila S2* cells I: Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. **Journal of Biotechnology**.v.143, p.103-110, 2009.

LIU,Z.; TYO,K.; MARTÍNEZ, J.; PETRANOVIC, D.; NIELSEN,J. Different Expression System for Production of Recombinant Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**. v.109, p.1259-1268, 2012.

MAILLARD, A.; 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.

MARANGA, L.; CRUZ, P.; AUNINS, G.; CARRONDO, M. Advanced in Biochemical Engineering Biotechnology: Tools and Applications of Biochemical Engineering Science. Chapter “Production of Core and Virus-like Paerticles with Baculovirus infected insect cells. Vol 74, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2002.

MASATANI, T.; ITO, N.; ITO, Y et al. Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-Mediated Antiviral Response. **Journal of Virology**.v.84, No.8, p. 4002-4012, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica, Séria A. Normas e Manuais Técnicos. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF, 2009. Disponível em [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_epidemiologica\\_7ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf) Acesso em: 20/08/2015.

MIRALLES, N.; ESPÍN, J.; CORCHERO, JL.; VÁSZQUEZ, E.; VILLAVERDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**.v.8, p.1-8, 2009.



MOHAMED, A. R. Animal Cell Culture, Cell Engineering v. 9. Digital version. **Springer International Publishing Switzerland**, 2015.

MORAES, A.; AUGUSTO, E.; CASTILHO, L. Tecnologia do Cultivo de Células Animais, de Biofármacos à Terapia Gênica. Primeira Edição. Editora Roca Ltda. SP, 2008.

MORAES, A. JORGE, S ; ASTRAY, R et al. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 613-628, 2012.

NASCIMENTO, P.; LEITE, L. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Brazilian Journal of Medical and Biotechnological Research**.v.45, p.1102-1111, 2012.

NORGATE, M. ; SOUTHON, A.; GREENOUGH, M. ; et al. Syntaxin 5 is required for Copper Homeostasis in *Drosophila* and Mammals.v.5, Issue 12, p1-10, 2010.

PALOMARES, L.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions. Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols.2º Edition. Humana Press Totowa, New Jersey, 2004.

PATIÑO, S.; ASTRAY, R.; C; PEREIRA, C.; et al. Transient expression of rabies virus glycoprotein (RVGP) in *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) cells. **Journal of Biotechnology**.v.192, p.255-262, 2014.

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

PORTAL DAS VACINAS. Centro Virtual de Toxicologia do CEVAP (Centro Interunidades de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP. Disponível em <http://www.vacinas.org.br/> e <http://www.cevap.org.br/>. Acesso em 23/10/2016.

PORTAL DO INSTITUTO BUTANTAN. Principal produtor de imunobiológicos do Brasil. Disponível em <http://www.butantan.gov.br/> . Acesso em 10/01/2016.

RADER, R. FDA Biopharmaceutical Product Approvals and Trends in 2012. **BioProcess International**. v.11(3), p.18-27, 2013.

ROCHA, L.; FARIA, J.; CRUZ, A.; REIS, A.; SANTOS, R.. *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de Genética. **Scire Salutis**, Aquidabã, v.3, n.1, p.37-48, 2013.

SARASWAT, M.; MUSANTE, L.; RAVIDÁ, A. et al. Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. **BioMed Research International**. v.2013. p.1-18, 2013.

SISSOEFF, L.; MOUSLI, M.; ENGLAND, P.; TUFFEREAU, C. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoproteins ectomain is required for interaction with the p75NTR receptor. *The Journal of General Virology*, v.86, n.9, p.2543-2552, 2005.

SAKAMOTO, S.; IDE, T.; TOKIYOSHI, 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.

SCARAFFIA, P.; WELLS, M. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. **Journal of Insect Physiology**.v.49, p.591-601, 2003.

SCHNELL, M.; MCGETTIGAN, J.; WIRBLICH, C.; PAPANERI, A. The Cell biology of rabies virus: using stealth to reach the grain. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p.51-61, 2010.

SWIECH, K. Identificação de aspectos cinéticos e fisiológicos chaves no cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2 para produção de glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) recombinante. 2007. 280f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SWIECH, K.; ROSSI, N.; SILVA, B.; et al. Bioreactor culture of recombinante *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies vírus glycoprotein. **Cytotechnology**.v.57, p.61-66, 2008.

SWIECH, K.; SILVA, C.; ARANTES, M.; et al. Characterization of growth and metabolismo of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v.49, p.41-49, 2008.

VARKI, A.; FREEZE, H.; GAGNEUX, P. Essentials of Glycobiology. 2<sup>nd</sup> Edition. **Cold Spring Harbor** (NY), 2009.

VAZ, A.; TAKEI, K.; BUENO, E. Imunoensaios, Fundamentos e aplicações. 1st ed. **Guanabara Koogan**, 2007.

ROSSI, N. Efeito da temperatura na otimização da produção de glicoproteína do vírus da raiva em cultivos em suspensão de células recombinantes de *Drosophila melanogaster* S2. 2008. 165f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.

VENTINI, D. C. Purificação e Imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células S2 e Semiliki forest vírus. 2014. 95f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, USP, Instituto Butantan/IPT. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

VENTINI, D. C.; ASTRAY, R.; LEMOS, M.; et al. Recombinant rabies vírus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or na inducible promoter. **Journal of Biotechnology**. v. 146, p.169-172, 2010.

WALSH, G. Biopharmaceutical Approval Trends in 2013. **The Science & Business of Biopharmaceuticals**, 2014. Disponível em <http://www.biopharminternational.com/biopharmaceuticals-approval-trends-2013>. Visualizado em 27/01/2016.

WANG, L. ; HU, H. ; YANG, J.; et al. High Yield of Human Monoclonal Antibody Produced by Stably Transfected *Drosophila* Schneider 2 Cells in Perfusion Culture Using *Wave* Bioreactor. **Molecular Biotechnology**.v.52, p.170-179, 2012.

WILSON, A.; NEUMANN, P. The cost-effectiveness of biopharmaceuticals, A look at the evidence. **mABs**. v.4:2, p.281-288, 2012.

WOJCZYK, B.; STWORA-WOJCZYK, M.; SHAKIN-ESHLEMAN,S.; WUNNER WH, SPITALNIK, S. 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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Rabies**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/> Acesso em: 20/08/2015

YANG, D., KIM, H., LEE, K., SONG, J. The present and future of rabies vaccine in animals. **Clinical and Experimental Vaccine Research**.v.2, p.19-25, 2013.

## **APÊNDICES**

Dados obtidos experimentalmente.

**Apêndice A: Crescimento celular**

Tabela A.1: Valores experimentais obtidos no Experimento 1. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à 28 °C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	5,04E+04	90,84
24	9,70E+05	1,31E+05	88,10
48	2,70E+06	1,56E+05	94,54
72	5,60E+06	3,81E+05	93,63
96	8,95E+06	1,21E+06	88,09
120	1,06E+07	8,12E+05	92,88
144	1,28E+07	4,12E+05	96,88
168	1,30E+07	1,16E+06	91,81
192	1,49E+07	1,18E+06	92,66

Tabela A.2: Valores experimentais obtidos no Experimento 2. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à 25 °C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	1,65E+05	75,19
24	9,43E+05	2,50E+05	79,04
48	2,60E+06	-	-
72	5,70E+06	4,10E+05	93,29
96	7,80E+06	2,50E+05	96,89
120	9,80E+06	1,20E+06	89,09
144	1,22E+07	1,91E+06	86,46
168	1,19E+07	1,65E+06	87,82
192	1,82E+07	2,03E+06	89,97

Tabela A.3: Valores experimentais obtidos no Experimento 3. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à 22 °C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	1,34E+05	78,86
24	5,75E+05	1,87E+05	75,46
48	1,28E+06	2,50E+05	83,66
72	2,19E+06	2,93E+05	88,20
96	5,60E+06	1,15E+06	82,96
120	7,75E+06	7,25E+05	91,45
144	9,56E+06	7,81E+05	92,45
168	1,27E+07	9,50E+05	93,04
192	8,10E+06	5,33E+06	60,31

Tabela A.4: Valores experimentais obtidos no Experimento 4. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução a 0 h de cultivo.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	8,40E+04	85,62
24	3,94E+05	3,56E+05	52,50
48	8,69E+05	3,44E+05	71,65
72	1,99E+06	4,69E+05	80,92
96	2,91E+06	5,31E+05	84,57
120	4,93E+06	3,31E+05	93,71
144	8,01E+06	3,81E+05	95,45
168	8,98E+06	4,50E+05	95,23
192	1,01E+07	7,88E+05	92,76

Tabela A.5: Valores experimentais obtidos no Experimento 5. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução a 24 h de cultivo.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	8,26E+04	85,82
24	7,00E+05	3,56E+05	66,27
48	1,44E+06	2,31E+05	86,16
72	2,83E+06	4,81E+05	85,47
96	3,69E+06	5,94E+05	86,14
120	5,89E+06	4,06E+05	93,55
144	7,45E+06	4,81E+05	93,93
168	8,28E+06	6,31E+05	92,92
192	9,04E+06	6,63E+05	93,17

Tabela A.6: Valores experimentais obtidos no Experimento 6. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução a 48 h de cultivo.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	1,18E+05	80,96
24	1,10E+06	2,00E+05	84,62
48	1,73E+06	2,25E+05	88,49
72	2,60E+06	1,13E+05	95,85
96	3,24E+06	6,19E+05	83,97
120	4,69E+06	3,25E+05	93,52
144	6,43E+06	4,50E+05	93,46
168	6,45E+06	6,69E+05	90,61
192	7,21E+06	6,50E+05	91,73

Tabela A.7. Valores experimentais obtidos no Experimento 7. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave*, com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1 L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 65%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	8,69E+04	85,19
24	1,01E+06	4,31E+05	70,13
48	2,79E+06	7,31E+05	79,22
72	6,67E+06	4,25E+05	94,01
96	9,34E+06	5,50E+05	94,44
120	1,07E+07	5,69E+05	94,95

Tabela A.8. Valores experimentais obtidos no Experimento 8. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave*, com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 65%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.

Tempo (h)	Densidade de células vivas (cel/mL)	Densidade de células mortas (cel/mL)	Viabilidade celular (%)
0	5,00E+05	4,62E+03	95,24
24	9,00E+05	2,50E+04	97,30
48	3,01E+06	3,75E+04	98,77
72	5,51E+06	6,88E+04	98,77
96	7,74E+06	8,75E+04	98,88
120	1,04E+07	1,38E+05	98,69

## Apêndice B: Quantificação de rRVGP

Tabela B.1: Valores experimentais de produção de rRVGP obtidos no Experimento 1. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), a 28 °C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo.

**Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.**

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em $10\text{E}+06$ células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
72	0,012	0,011	0,012	0,001	6,011	33,656
96	0,060	0,063	0,062	0,002	25,644	229,478
120	0,104	0,114	0,109	0,007	47,217	500,532
144	0,135	0,137	0,136	0,001	60,638	776,192
168	0,169	0,161	0,165	0,006	75,911	986,830
192	0,122	0,111	0,117	0,008	50,865	757,814

### Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP

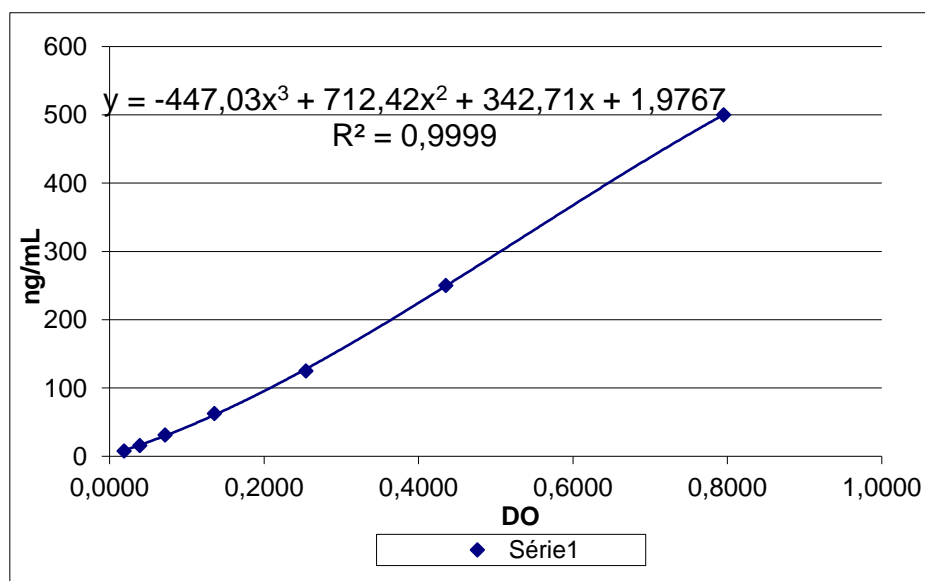




Tabela B.2: Valores experimentais de produção de rRVGP obtidos no Experimento 2. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à 25 °C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo.

**Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.**

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em $10\text{E}+06$ células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
72	0,007	0,005	0,006	0,001	2,878	16,416
96	0,042	0,033	0,038	0,006	24,232	188,994
120	0,053	0,034	0,044	0,013	28,263	293,904
144	0,056	0,037	0,047	0,013	30,275	369,294
168	0,101	0,059	0,080	0,030	52,607	626,059
192	0,049	0,053	0,051	0,003	33,288	605,878

**Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP**

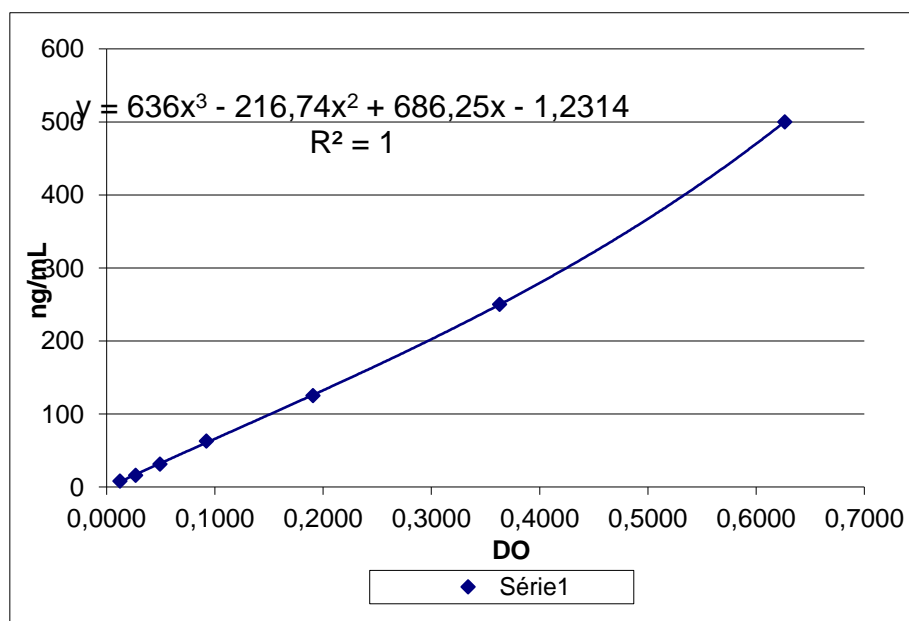


Tabela B.3.: Valores experimentais de produção de rRVGP obtidos no Experimento 3. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por CUSO<sub>4</sub> em frasco Schott (V<sub>frasco</sub>=100 mL; V<sub>trabalho</sub>=20 mL), à 22 °C, com agitação de 100 rpm e indução à 96 h de cultivo.

**Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.**

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em 10E+06 células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
96	0,006	0,004	0,005	0,001	2,910	16,294
120	0,015	0,018	0,008	0,002	3,959	30,686
144	0,009	0,006	0,092	0,001	39,539	377,988
168	0,092	0,091	0,087	0,012	37,401	474,997
192	0,026	0,024	0,025	0,001	11,321	91,697

**Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP**

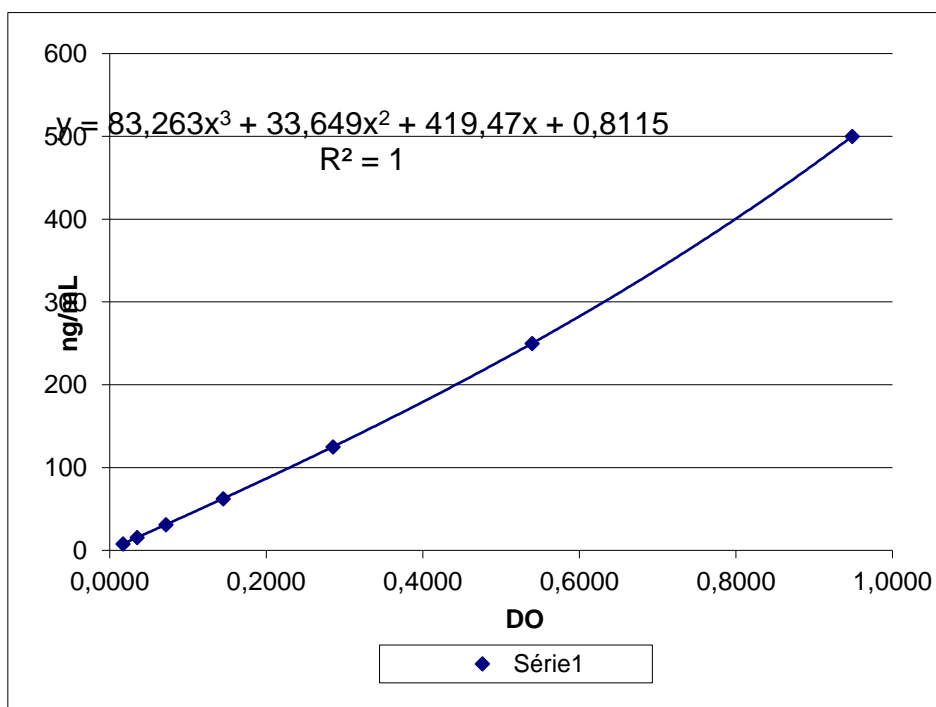


Tabela B.4: Valores experimentais obtidos no Experimento 4. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CuSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100\text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}}=20\text{ mL}$ ), à  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução a 0 h de cultivo.

### Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em $10\text{E}+06$ células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
0	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
48	0,032	0,054	0,043	0,015	10,650	9,244
72	0,019	0,017	0,018	0,001	5,119	10,136
96	0,023	0,023	0,023	0	5,119	10,136
120	0,069	0,067	0,068	0,001	16,187	79,801
144	0,013	0,015	0,014	0,001	4,235	33,878
168	0,057	0,049	0,053	0,005	12,864	115,390
192	0,065	0,068	0,066	0,002	15,854	158,544

### Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP

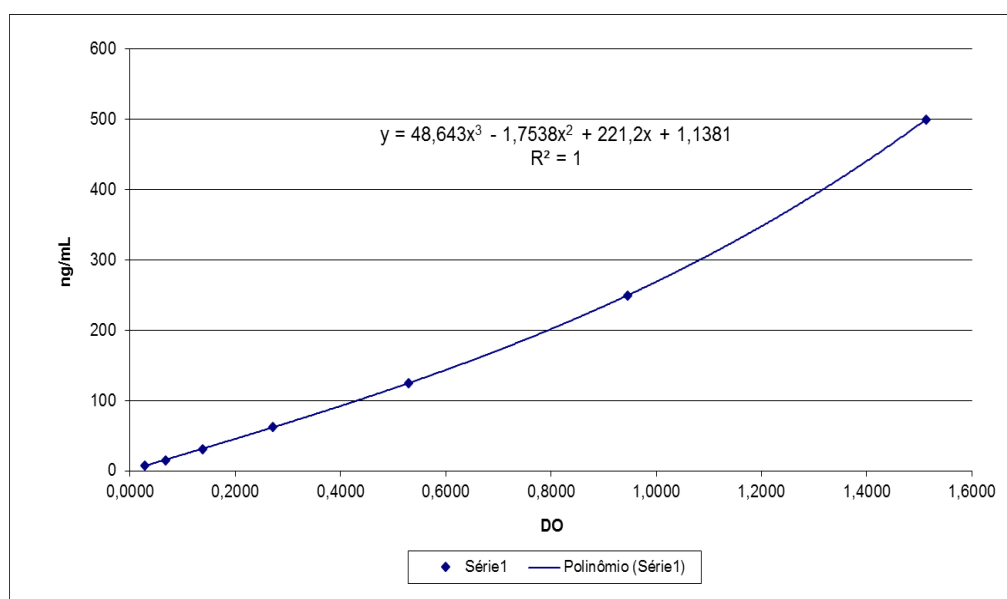


Tabela B.5: Valores experimentais obtidos no Experimento 5. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100\text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}}=20\text{ mL}$ ), à  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução a 24 h de cultivo.

### Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em $10\text{E}+06$ células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
24	0,033	0,037	0,035	0,003	8,880	6,660
48	0,048	0,076	0,062	0,020	14,857	21,395
72	0,033	0,032	0,0325	0,001	8,327	23,565
96	0,063	0,07	0,0665	0,005	15,854	58,503
120	0,072	0,071	0,0715	0,001	16,963	99,910
144	0,026	0,024	0,025	0,001	6,668	49,675
168	0,023	0,026	0,024	0,002	6,447	54,293
192	0,051	0,051	0,051	0	12,421	112,228

### Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP

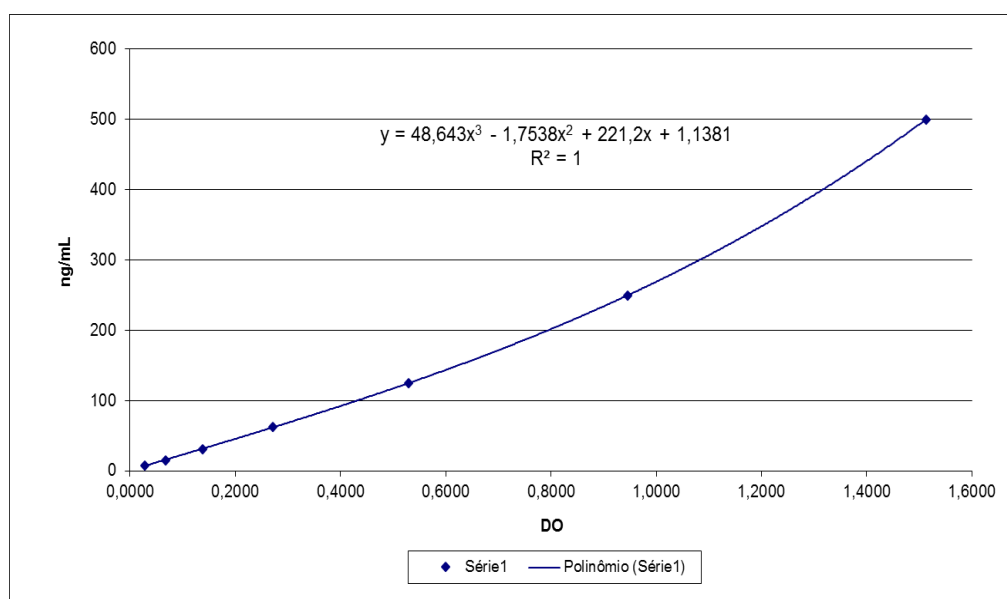


Tabela B.6: Valores experimentais obtidos no Experimento 6. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192 h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100\text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}}=20\text{ mL}$ ), à  $28^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução a 48 h de cultivo.

### Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em $10\text{E}+06$ células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
48	0,020	0,018	0,019	0,001	5,341	9,239
72	0,029	0,031	0,03	0,001	7,774	20,212
96	0,022	0,029	0,0255	0,005	6,779	21,962
120	0,034	0,033	0,0335	0,001	8,548	40,091
144	0,020	0,020	0,020	0	5,562	35,762
168	0,019	0,013	0,016	0,004	4,677	30,167
192	0,041	0,040	0,040	0,001	10,097	72,800

### Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP

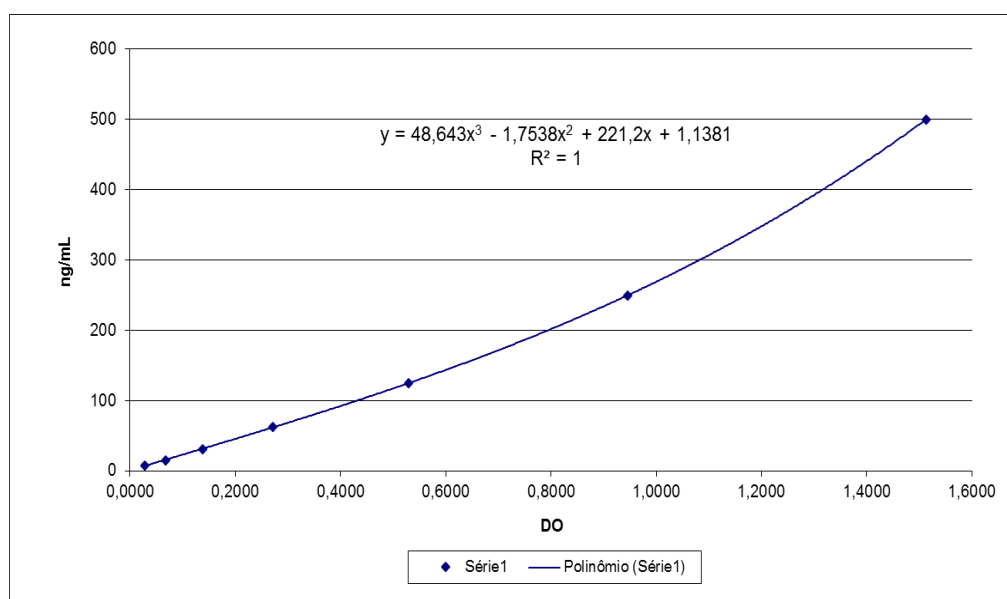


Tabela B.7. Valores experimentais obtidos no Experimento 7. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave*, com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 65%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.

**Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.**

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em 10E+06 células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
72	0,121	0,085	0,103	0,025	42,770	192,29
96	0,064	0,094	0,079	0,021	24,426	336,28
120	0,189	0,151	0,170	0,027	88,11	942,79

**Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP**

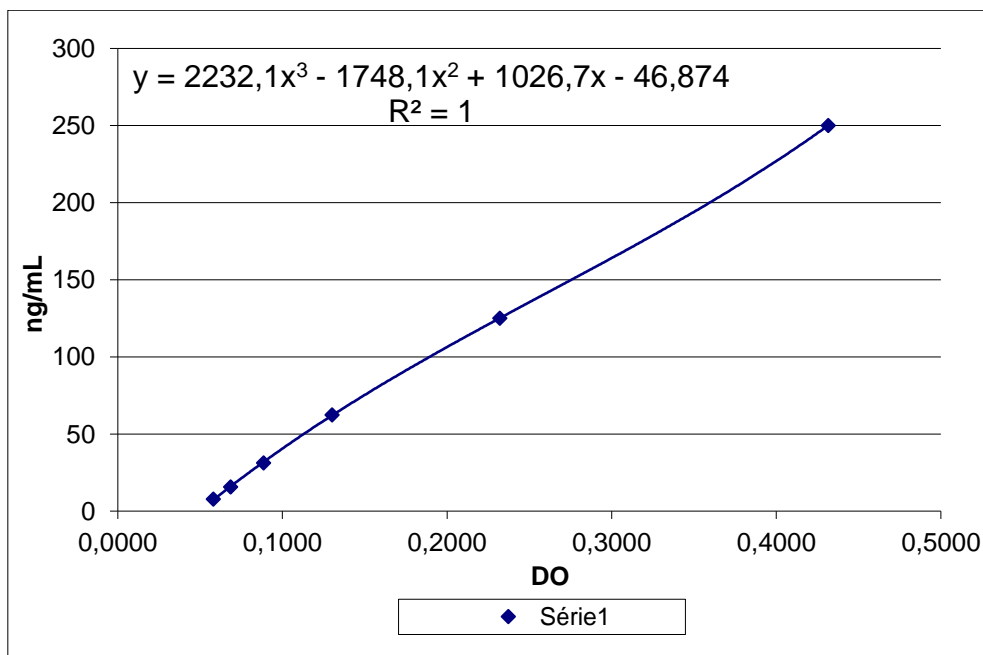
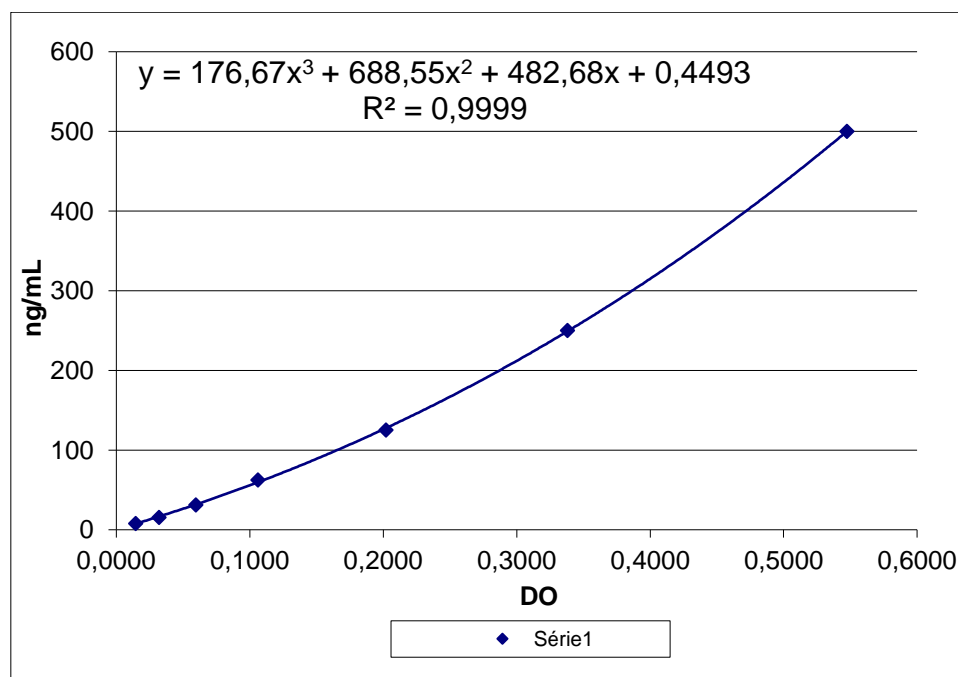


Tabela B.8. Valores experimentais obtidos no Experimento 8. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave*, com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 65%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.

**Valores de densidade óptica (DO) associadas a cada valor de rRVGP.**

Tempo (h)	DO 1	DO 2	DO média	Desvio Padrão	Valor obtido de rRVGP (ng/mL) em 10E+06 células	Concentração de rRVGP no cultivo (ng/mL)
72	0,019	0,023	0,021	0,003	10,891	59,968
96	0,034	0,204	0,119	0,120	17,663	136,670
120	0,070	0,187	1,129	0,083	74,218	770,940

**Curva Padrão do Teste de Elisa – quantificação da rRVGP**



**Apêndice C: Consumo de substratos e formação de produtos**

Tabela C.1: Valores experimentais de consumo de substratos e formação de produtos obtidos no Experimento 1. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}}=20 \text{ mL}$ ), à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo.

Substratos/ Produtos (mM)	Tempo (h)				
	0 h	48 h	96 h	144 h	192 h
asp	6,516	6,416	5,891	6,234	4,76
glu	7,145	7,362	6,184	5,36	3,502
asn	10,22	10,725	7,896	4,543	1,932
ser	3,154	3,513	2,665	2,258	1,495
gln	8,047	6,651	3,659	2,477	1,893
gli	2,781	3,159	2,752	2,56	2,151
his	1,431	1,646	1,505	1,557	1,485
arg	4,576	5,228	4,836	5,035	4,603
thr	2,174	2,241	1,684	1,514	1,24
ala	0,86	6,564	13,638	19,797	20,253
pro	5,009	5,13	3,025	1,608	0,736
tyr	1,286	1,423	1,265	1,215	1,027
val	4,934	5,461	4,674	4,023	3,075
met	6,808	7,975	7,516	7,495	7,059
cys	0,738	0,609	0,43	0,389	0,163
ile	5,925	6,49	4,843	3,288	1,764
leu	2,537	2,748	1,979	1,107	0,357
phe	6,089	7,115	6,737	6,95	6,701
lis	3,166	3,53	3,085	2,762	2,368
glicose	54,9	52,8	46,0	35,7	19,6
lactato	0,14	0,118	0,14	0,16	0,16
amônia (mg/L)	1,66	2,08	3,52	5,48	6,42



Tabela C.2: Valores experimentais de consumo de substratos e formação de produtos obtidos no Experimento 2. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192h com indução por CUSO<sub>4</sub> em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100$  mL;  $V_{\text{trabalho}}=20$  mL), à 25 °C, com agitação de 100 rpm e indução à 72 h de cultivo.

Substratos/ Produtos (mM)	Tempo (h)				
	0 h	48 h	96 h	144 h	192 h
asp	7,44	7,45	7,47	7,48	7,49
glu	8,5	7,24	6,98	5,41	6,79
asn	11,71	9,52	7,60	2,89	0,81
ser	4,36	3,3	2,98	2,05	1,47
gln	10,56	7,05	4,42	2,33	1,68
gli	4,25	4,17	3,95	2,98	2,69
his	2,14	1,75	1,79	1,46	1,39
arg	6,07	4,88	5,10	4,42	4,66
thr	3,32	3,08	2,29	1,52	1,2
ala	1,29	5,45	16,15	20,15	24,73
pro	6,46	4,02	3,13	1,12	0,42
tyr	1,97	1,78	1,60	1,26	1,35
val	7,31	6,38	5,82	4,5	3,94
met	9,69	8,6	9,06	7,12	7,58
cys	0,67	0,46	0,29	0,17	0,07
ile	8,68	7,35	4,64	3,71	2,96
leu	3,8	3,04	2,27	1,17	0,84
phe	9,36	8,28	8,11	7,3	7,92
lis	4,89	4,14	3,64	3,31	2,99
trp	0,7	0,61	0,57	0,51	0,85
glicose	52,0	49,3	45,3	36,4	20,2
lactato	0,11	0,15	0,14	0,16	0,29
amônia (mg/L)	2,21	3,71	6,96	11,2	13,2

Tabela C.3: Valores experimentais de consumo de substratos e formação de produtos obtidos no Experimento 3. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 192h com indução por  $\text{CUSO}_4$  em frasco Schott ( $V_{\text{frasco}}=100 \text{ mL}$ ;  $V_{\text{trabalho}}=20 \text{ mL}$ ), à  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , com agitação de 100 rpm e indução à 96 h de cultivo.

Substratos/ Produtos (mM)	Tempo (h)				
	0 h	48 h	96 h	144 h	192 h
asp	5,929	5,543	5,026	5,19	5,501
glu	6,564	5,921	5,258	4,578	4,02
asn	9,964	8,983	7,811	5,659	3,083
ser	2,816	2,915	2,587	2,215	1,513
gln	8,317	6,558	4,449	3,128	2,517
gly	3,695	3,55	3,178	2,939	2,519
his	1,656	1,625	1,529	1,484	1,391
arg	4,567	4,44	4,258	4,282	4,198
thr	2,077	1,992	1,716	1,493	1,168
ala	1,046	4,512	9,152	15,039	17,685
pro	5,553	5,077	3,957	2,618	1,525
tyr	1,652	1,624	1,488	1,416	1,195
val	6,18	5,941	5,346	4,679	3,409
met	7,871	7,669	7,36	7,201	6,579
cys	0,461	0,4	0,264	0,201	0,119
ile	7,296	6,859	5,731	4,142	2,156
leu	3,063	2,797	2,257	1,493	0,591
phe	7,559	7,43	7,172	7,183	6,729
trp	0,649	0,632	0,623	0,622	0,556
lis	3,442	3,199	3,02	2,809	2,418
glicose	50,1	48,15	45,6	41,15	31,75
lactato	0,17	0,24	0,21	0,18	0,16
amônia (mg/L)	2,37	3,25	4,76	7,46	11,2

Tabela C.4: Valores experimentais obtidos no Experimento 7. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave*, com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 65%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.

Substratos/ Produtos (mM)	Tempo (h)					
	0	24	48	72	96	120
asp	5,675	5,775	6,122	6,365	6,089	5,168
glu	6,014	6,044	6,152	5,785	5,052	3,959
asn	13,429	12,855	12,655	11,162	8,33	3,602
ser	2,443	2,273	2,921	2,278	2,337	1,742
gln	8,22	6,93	6,714	4,477	2,674	1,209
gly	3,1	2,936	3,053	2,788	2,717	2,377
his	1,357	1,367	1,437	1,34	1,352	1,224
arg	3,769	3,796	3,996	3,922	3,865	3,847
thr	1,535	1,435	1,457	1,377	1,332	0,955
ala	0,881	2,632	-	9,28	13,769	18,966
pro	4,364	3,971	4,924	2,635	1,765	1,057
tyr	1,189	1,202	1,247	1,204	1,061	1,072
val	3,926	3,817	3,835	3,609	3,23	2,982
met	5,8	5,645	5,954	5,77	0,471	5,478
cys	0,329	0,332	0,314	0,214	0,197	0,218
ile	5,272	4,917	4,758	4,231	3,457	2,879
leu	2,127	2,015	1,919	1,614	1,22	0,953
phe	5,281	5,18	5,378	5,312	5,148	0,062
lis	2,1	2,087	2,043	2,049	1,902	1,947
glicose	52,6	51,2	46,2	42,2	43,9	35,8
lactato	0,02	0,03	0,02	0,02	0,05	0,19
amônia (mg/L)	7,9	14	17	24	30	39

Tabela C.5: Valores experimentais obtidos no Experimento 8. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His por 120 h em biorreator *Wave*, com volume de 650 mL em *Cellbag* de 1L de volume de trabalho. O biorreator foi iniciado nas seguintes condições: inóculo de  $5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, temperatura de 28°, concentração de oxigênio dissolvido próxima de 65%, pH 6,25, agitação 20 rpm e ângulo de 8°. O tempo da adição de CuSO<sub>4</sub> foi de 72 h.

Substratos/ Produtos (mM)	Tempo (h)					
	0	24	48	72	96	120
asp	5,597	4,416	4,010	5,052	4,589	3,421
glu	6,386	5,569	4,951	5,551	4,689	3,272
asn	11,099	11,040	9,793	9,401	7,323	3,415
ser	3,021	3,161	2,881	2,582	2,321	1,561
gln	7,867	7,060	5,598	4,282	2,900	1,234
gly	2,873	3,125	2,962	2,832	2,669	2,030
his	1,310	1,412	1,342	1,346	1,321	1,024
arg	4,151	4,441	3,992	4,021	3,982	3,192
thr	2,161	2,681	2,931	2,781	3,210	2,019
ala	0,947	3,239	5,490	8,983	14,289	15,535
pro	4,132	4,237	3,766	2,735	2,109	0,986
tyr	0,230	0,210	0,276	1,419	1,389	1,107
val	1,157	1,167	1,164	4,789	4,731	3,534
met	7,691	7,612	7,761	7,006	7,221	5,751
cys	0,389	0,300	0,315	0,264	0,283	0,218
ile	6,534	6,599	6,329	5,418	5,013	3,475
leu	2,730	2,543	2,522	2,018	1,793	1,136
phe	6,749	6,772	6,861	6,319	6,583	5,414
lis	2,341	2,341	2,295	2,358	2,267	2,097
glicose	54,5	52,9	51,6	49,2	45,4	38,3
lactato	0,018	0,015	0,014	0,016	0,017	0,014
amônia (mg/L)	11,7	15,3	16,4	22,3	28,2	38,8