

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

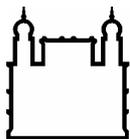
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**OBTENÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-
DENGUE TIPO 2 EM DIFERENTES MEIOS E SISTEMAS DE
CULTIVO**

ALINE STELLING ZANATTA

Rio de Janeiro

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ALINE STELLING ZANATTA

**Obtenção de Anticorpo Monoclonal Anti-Dengue
tipo 2 em Diferentes Meios e Sistemas de Cultivo**

Dissertação de pós-graduação *stricto sensu* apresentada à coordenação do Mestrado Profissional de Tecnologia em Imunobiológicos.

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2009.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

Z27

Zanatta, Aline Stelling

Obtenção de anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em diferentes meios e sistemas de cultivo / Aline Stelling Zanatta. – Rio de Janeiro, 2009.

xviii, 90 f. : il. ; 30 cm.

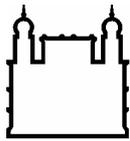
Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia em Imunobiológicos, 2009.

Bibliografia: f. 80-90

1. Anticorpo monoclonal. 2. Dengue tipo 2. 3. Meios de cultivo celular.
4. Sistemas de cultivo celular. I. Título.

CDD 616.91852

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico sob a orientação da Dr.^a Marta Cristina de Oliveira Souza e da Dr.^a Leda dos Reis Castilho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

Aline Stelling Zanatta

**OBTENÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-
DENGUE TIPO 2 EM DIFERENTES MEIOS E SISTEMAS DE
CULTIVO**

**ORIENTADORES: Dra. Marta Cristina de Oliveira Souza e
Dra. Leda dos Reis Castilho**

Dissertação defendida e aprovada em 30 de junho de 2009.

EXAMINADORES:

**Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto (Presidente)
Fiocruz**

**Dr. Ricardo de Andrade Medronho
UFRJ**

**Dr. Marcos Barcelos de Pinho
UFRJ**

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2009.

Aos meus pais Lêda e Zaldir, por tantos motivos que não conseguiria aqui discorrer.

Ao meu marido Adilson, meu companheiro e meu grande amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fiocruz e a Biomanguinhos pela oportunidade de cursar este mestrado.

Agradeço as minhas orientadoras, Dra. Marta Cristina de Oliveira e Souza e Dra. Leda dos Reis Castilho, pelo privilégio de aprender com elas e por exercerem completamente o significado da palavra orientação.

Agradeço a meus pais por serem sempre maravilhosos, mesmo quando deles discordo.

Agradeço a meu marido, Adilson, por ser meu “Norte” e pela enorme paciência, capaz de suportar meu humor nestes dois anos e meio de estudos contínuos e ainda conseguir ajudar-me durante a realização desta dissertação.

Agradeço a minha irmã, Solange, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando longe, suportar minha falta de paciência e ainda ajudar-me na realização desta dissertação.

A meus companheiros Alma, Haroldo, Abelardo, Amora, Ágatha, April, Amanda, Annabel, Assis, Ayla, Amy, Amália, Angélica, Aslam, Archimedes, Vitor, Annya, Zelda, Apolo, Alexia, Sandra, Anaia e tantos outros, por me compreenderem sempre, mesmo sem nada dizer.

A Elisa Laranja por ter me possibilitado sobreviver aos últimos três anos.

A meus amigos do Latam: Márcia Arissawa, por dar-me sempre o incentivo de que precisava; Sheiva Roitman, pelos conselhos e por dividir comigo todas as alegrias e tristezas; Carlos Humberto Marques, meu maior incentivador; João Luiz Queiroz, por ensinar-me a arte do cultivo celular; Márcia Pimenta, pelo companheirismo inabalável; Roberto Campelo, pelas sugestões indispensáveis para a conclusão deste trabalho; Lívia Pereira, pela alegria contagiante da juventude; Álvaro Paiva, pelo sangue novo injetado em todos nós.

Às amigas Renata Bastos e Ana Paula dos Santos, por todo o apoio e por não medirem esforços em me ajudar a realizar os ensaios de dosagem de amônio.

Ao Dr. Leon Rabinovitch, por sua enorme simpatia e disponibilidade em partilhar seu grande conhecimento.

A todos os colegas de turma do MPTI, os quais se tornaram meus amigos, por terem me proporcionado momentos inesquecíveis, fossem alegres ou difíceis, mas que, sem dúvida tornaram-me uma pessoa mais jovem e feliz.

À coordenação e secretaria do MPTI, Dra. Sheila Farage, Zaíra Prado e Andréa Ayrosa, “mães” sem cujos cuidados, este período de estudos teria se tornado muito mais difícil de atravessar e a Michele Teixeira por toda atenção e preocupação.

Ao amigo José Procópio Senna, pelas conversas enriquecedoras, que tanto ajudaram a encaminhar os experimentos deste trabalho.

Aos amigos do Latev, que sempre me apoiaram logística e moralmente desde que trabalhamos juntos. Em especial, às amigas Anna Yoshida e Maria Beatriz Borges, que além de amigas para todas as horas, ainda auxiliaram na execução e compreensão do ensaio de PRNT. Agradeço também a Max Areas, por sempre ter um tempinho para resolver um problema “em cima da hora”.

À amiga Leonora Vieira, por estar sempre disposta a ajudar, portando sempre um grande sorriso no rosto.

Aos amigos do LECC, pela hospitalidade em me receber, pela paciência em me ajudar a qualquer momento, permitindo-me fazer novos e bons amigos, dividindo as agruras de ser estudante.

A todo o grupo do Setor de Patologia do Instituto Fernandes Figueira – Fiocruz –, especialmente ao Dr. Jânio Alves Cordeiro e ao Dr. Antônio Carlos Bonifácio pela disposição em colaborar nas tentativas de realização das dosagens de IgG.

E a todos, que durante o período de realização deste trabalho, tenho certeza que foram fonte de energias positivas – a minha “torcida” – que tanto facilitou a superação de todos os obstáculos.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade a qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE NOMENCLATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Anticorpos Monoclonais	7
1.2 Sistemas de Produção de Anticorpos Monoclonais	13
1.2.1 Produção de anticorpos monoclonais <i>in vivo</i>	13
1.2.2 Produção de anticorpos monoclonais <i>in vitro</i>	15
1.2.2.1 Produção de anticorpos monoclonais em sistemas estáticos	16
1.2.2.2 Produção de anticorpos monoclonais em sistemas agitados.....	19
1.2.2.2.1 Garrafas Rotatórias (<i>roller</i>)	19
1.2.2.2.2 Frascos agitados do tipo <i>spinner</i>	21
1.2.2.2.3 Biorreatores	22
1.2.2.3 Modos de operação de sistemas de cultivo.....	28
1.3 Meios de Cultivo Livres de Soro	30
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Material	38
3.1.1 Linhagem celular	38
3.1.2 Meios de cultivo.....	38
3.1.2.1 Meio de cultivo suplementado com soro.....	38
3.1.2.2 Meio de cultivo livre de soro.....	39
3.1.3 Reagentes	39
3.2 Sistemas de Cultivo	40
3.2.1 Frascos de cultivo estático	40
3.2.2 Garrafas Rotatórias	40
3.2.3 Frascos do tipo <i>spinner</i>	40
3.3 Metodologia Experimental	41
3.3.1 Estoque celular.....	41
3.3.2 Crescimento celular	42
3.3.2.1 Propagação das células em sistema estático	42
3.3.2.2 Propagação das células em garrafas rotatórias	43
3.3.2.3 Propagação das células em frascos agitados do tipo <i>spinner</i>	43
3.3.3 Adaptação das células ao cultivo em sistemas agitados.....	43
3.3.3.1 Adaptação segundo Sinacore <i>et al.</i> (2000).....	43
3.3.3.2 Adaptação segundo Scharfenberg e Wagner (1995)	43
3.3.3.3 Adaptação aumentando gradativamente a rotação do sistema <i>roller</i>	44
3.3.4 Transferência das células para o meio livre de soro.....	44
3.3.5 Determinações analíticas.....	44
3.3.5.1 Determinação da concentração e viabilidade celular	44
3.3.5.2 Determinação da concentração de nutrientes essenciais, metabólitos tóxicos e produto	45
3.3.5.2.1 Determinação da concentração de glicose	45
3.3.5.2.2 Determinação da concentração de glutamina	45
3.3.5.2.3 Determinação da concentração de amônio	46
3.3.5.2.4 Determinação da concentração de lactato.....	46

3.3.6	Determinação da concentração de anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2	46
3.3.7	Confirmação da produção do anticorpo anti-dengue tipo 2	47
3.3.8	Avaliação de grandezas representativas do metabolismo celular.....	48
3.3.8.1	Determinação da taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}).....	48
3.3.8.2	Determinação dos coeficientes de rendimento de nutrientes em células ($Y_{X/glc}$ e $Y_{X/gln}$)	48
3.3.8.3	Determinação do coeficiente de rendimento de células em produto ($Y_{p/X}$).....	49
3.3.8.4	Determinação dos coeficientes de rendimento de nutrientes em metabólitos ($Y_{lac/glc}$ e $Y_{NH_4/gln}$)	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Cultivo de hibridomas anti-dengue tipo 2 em sistema estático	51
4.2	Cultivo de hibridomas anti-dengue tipo 2 em sistemas agitados	58
4.2.1	Adaptação a sistemas agitados	58
4.2.2	Cultivo em frascos <i>spinner</i> com células adaptadas em <i>roller</i>	63
4.3	Comparação do cultivo de hibridomas e produção de anticorpo em meio de cultivo adicionado de SFB e livre de soro.....	70
4.4	Comparação do cultivo de hibridomas e produção de anticorpo entre os sistemas de cultivo utilizados	74
4.5	Comparação da avaliação da produção de anticorpo segundo dois métodos de análise....	76
4.6	Comparação da produção de anticorpo in vivo e in vitro	77
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	78
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AcNPV NOV – vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (*Autographa californica nuclear polyedrosis virus*).
- ATCC – Coleção americana de culturas-tipo (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA).
- ATP – adenosina trifosfato.
- BALB/c – linhagem de camundongos albinos, criada em laboratório, da qual algumas sublinhagens são derivadas; são isogênicos e utilizados para experimentação.
- BCR – receptor de célula B (*B cell receptor*).
- BHK-21 – linhagem celular originária de rim de hamster sírio recém-nascido (*baby syrian hamster kidney*).
- BSA – soro albumina bovina.
- CDs – receptores de células do sistema imune específicos para determinados antígenos.
- CDC – Centro de controle de doenças (*Center for Disease Control – EUA*).
- CDR – região determinante de complementariedade (*complementary determing region*).
- CHO – linhagem celular originária de ovário de hamster chinês (*chinese hamster ovary*).
- CGLAB – Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública.
- COPPE – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia.
- DENV – vírus do dengue.
- DERED – Departamento de Reativos para Diagnóstico
- DMEM – meio de cultivo celular *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.
- DMSO – dimetil sulfóxido.
- DNA – ácido desoxirribonucleico (*desoxiribonucleic acid*).
- EGF – fator de crescimento epidérmico (*epidermic growth factor*).
- EIE – ensaio imunoenzimático
- ELISA – ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*).
- EMEA – Agência europeia de medicina (*European Medicine Agency*).
- EUA – Estados Unidos da América (*Unidet States of America*).
- FDA – órgão governamental americano para controle e normatização da distribuição de alimentos e fármacos (*Food and Drug Administration*).
- FGF – fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*).
- HACA – anticorpo humano anti-anticorpo quimérico (*human anti-chimeric antibody*).
- HAMA – anticorpo humano anti-anticorpo murino (*human anti-murine antibody*).
- HAT – meio de cultivo de hibridomas contendo hipoxantina, aminopterina e timidina; utilizado durante o processo de hibridização.
- HEPES – agente tamponante utilizado comumente em meios de cultivo de células (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*).

HIV – vírus causador da Síndrome de imunodeficiência humana.

IgA – Imunoglobulina A.

IgD – Imunoglobulina D.

IgE – Imunoglobulina E.

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor*).

IgG – Imunoglobulina G.

IgM – Imunoglobulina M.

IL – interleucina.

Latam - Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais.

LACEN - Laboratórios Centrais de Saúde Pública

LECC – Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares.

MDCK – linhagem celular de epitélio de rim de cão (*Madin-Darby canine kidney epithelial cells*).

MWCO - massa molar de corte (*molecular weight cut off*).

NAD⁺ – nicotinamida adenina nucleotídeo.

NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina.

NS0 – linhagem celular utilizada para produção de hibridomas.

NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – proteínas não-estruturais do vírus do dengue.

OKT3 – primeiro anticorpo monoclonal aprovado para uso terapêutico; de origem murina.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde.

ORF – cada uma das sequências de DNA compreendidas entre um código de iniciação (ATG) da tradução e um código de terminação, descontando as sequências que correspondem aos íntrons (*open reading frame*).

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*).

PEG – polietilenoglicol.

PRNT – teste de redução da neutralização de placas de lise (*plaque reduction neutralization test*).

RPMI – meio de cultivo utilizado para células animais e hibridomas.

SFB – soro fetal bovino.

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

VH – porção variável da cadeia pesada de um anticorpo.

VDTEC – Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico

VL – porção variável da cadeia leve de um anticorpo.

WHO – Organização mundial da Saúde (*World Health Organization*).

LISTA DE NOMENCLATURAS

Glc – concentração de glicose.

Gln – concentração de glutamina.

μ_{exp} – taxa específica de crescimento celular na fase exponencial.

P – concentração de IgG (produto).

t – tempo.

t_d – tempo de duplicação celular.

$X_{\text{máx}}$ – máximo de concentração celular.

$Y_{\text{lac/glc}}$ – coeficiente de rendimento de glicose em lactato.

$Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$ – coeficiente de rendimento de glutamina em amônio.

$Y_{\text{P/X}}$ – coeficiente de rendimento de células em produto.

$Y_{\text{X/glc}}$ – coeficiente de rendimento de glicose em células.

$Y_{\text{X/gln}}$ – coeficiente de rendimento de glutamina em células.

LISTA DE FIGURAS

Número	Descrição	Página
Figura 1.1	O vírus do dengue. (A) Capsídeo: as glicoproteínas formam grupos em forma de ponta (<i>spikes</i> , rodeado por um círculo branco), os quais tornam a superfície rugosa. (B) Envelope originado do hospedeiro torna a superfície lisa (modificado de Qi <i>et al.</i> , 2008).	2
Figura 1.2	Gráfico de dados epidemiológicos do dengue (adaptado de Nogueira <i>et al.</i> , 2007).	3
Figura 1.3	Esquema do EIE para diagnóstico de dengue. Adaptado da bula do kit fabricado por Biomanguinhos – Fiocruz.	5
Figura 1.4	Estrutura esquemática da molécula de um anticorpo (imunoglobulina): (a) os dois braços da molécula de anticorpo, em forma de Y, contem as regiões variáveis (em vermelho), que formam os dois sítios idênticos de ligação com o antígeno; o tronco (em azul) é chamado de região constante; (b) dois tipos de cadeias de uma molécula de anticorpo, a cadeia pesada (em verde) e a leve (em amarelo); há duas cadeias idênticas de cada tipo em cada molécula de anticorpo, ligadas, entre si, por pontes dissulfeto (adaptado de Janeway <i>et al.</i> , 2002).	8
Figura 1.5	Esquema da obtenção e seleção de hibridomas para produção de anticorpos monoclonais (adaptado de Janeway <i>et al.</i> , 2002).	10
Figura 1.6	Esquema de uma imunoglobulina, destacando as três regiões hipervariáveis: CDR1, 2 e 3 (adaptado de Tamashiro <i>et al.</i> , 2008).	12
Figura 1.7	Esquema da produção de anticorpos monoclonais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (adaptado de Tamashiro <i>et al.</i> , 2008).	15
Figura 1.8	Frascos T para cultivo celular em sistema estático (BD Falcon, 2009).	17
Figura 1.9	Sistemas de cultivo estático com maiores superfícies de adesão (a) frasco T com superfície expandida (Corning, 2007); (b) sistema de cultivo <i>Cell Factory</i> (Nunc, 2005); (c) bandejas de cultivo do sistema <i>Cell Factory</i> (Nunc, 2005); (d) detalhe do sistema de fluxo de gases sistema de cultivo <i>Cell Factory</i> (Nunc, 2005); sistema de cultivo <i>CellCube</i> (Corning, 2007).	18
Figura 1.10	Garrafas <i>roller</i> . (a) visão geral das garrafas de 850 cm ² de superfície interna, como as utilizadas neste trabalho; (b) disposição das garrafas quando em processo de cultivo, sobre o aparelho gerador de rotação (Greiner Bio-One, 2009).	20
Figura 1.11	Esquema de frascos <i>spinner</i> . (a) frasco <i>spinner</i> com barra magnética central; (b) frasco <i>spinner</i> com barra magnética pendular (Doyle e Griffiths, 2000).	22
Figura 1.12	Esquema do biorreator <i>wave</i> em cultivo contínuo em perfusão (adaptado de Tang <i>et al.</i> , 2007).	25

Figura 1.13	Esquema do módulo de produção dos biorreatores com membranas permeáveis, mostrando como ocorre a troca de gases, de nutrientes e de metabólitos (Integra, 2007).	26
Figura 1.14	Sistema empregado no cultivo de células no biorreator de superfície permeável MiniPERM.	27
Figura 1.15	Esquemas dos modos de operação de processos de cultivo de células animais (Castilho e Medronho, 2002).	28
Figura 3.1	Sistema de rotação das garrafas <i>roller</i> : (a) visão do sistema de rotação dentro da incubadora; (b) visão frontal do aparelho de controle digital de rotação.	40
Figura 3.2	Sistema empregado no cultivo do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em frascos agitados do tipo <i>spinner</i> .	41
Figura 4.1	Foto do hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue tipo 2, sob microscópio óptico (aumento de 125x), após 4 dias de cultivo em frasco T, meio DMEM, adicionado de 10% de SFB.	52
Figura 4.2	Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos T (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).	52
Figura 4.3	Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos T (média das duplicatas dos cultivos) em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).	53
Figura 4.4	Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos <i>spinner</i> a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em frascos T, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).	59
Figura 4.5	Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas <i>roller</i> a 4 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).	60
Figura 4.6	Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas <i>roller</i> a 16 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).	61
Figura 4.7	Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas <i>roller</i> a 16 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).	62

- Figura 4.8 Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 16 rpm, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b). 64
- Figura 4.9 Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas *roller* a 40 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b). 65
- Figura 4.10 Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas *roller* a 40 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b). 65
- Figura 4.11 Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 32 rpm, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b). 66
- Figura 4.12 Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 32 rpm, em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b). 67
- Figura 4.13 Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b). 67
- Figura 4.14 Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm, em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b). 68
- Figura 4.15 Perfil comparativos do crescimento (▲) do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em: frascos T, garrafas *roller* a 16 rpm (c e d) e a 40 rpm (e e f); frascos *spinner* a 50 rpm inoculados com células adaptadas garrafas *roller* a 32 rpm (g e h) e inoculados com células adaptadas em garrafas *roller* a 40 rpm (i e j). Viabilidade celular (■) e produção de anticorpo (IgG) (●); meio DMEM com 10% de SFB (—) e meio Ex-Cell (---) (média das duplicatas dos cultivos). 71

Figura 4.16 Perfis comparativos do crescimento (\blacktriangle) e produção de anticorpo (IgG) (\bullet) do hibridoma anti-dengue tipo 2, cultivado em frascos T (---), garrafas *roller* a 16 rpm (---) e frascos *spinner* a 50 rpm, inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm (---) (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB (a) e em meio Ex-Cell para hibridomas (b).

LISTA DE TABELAS

Número	Descrição	Página
Tabela 1.1	Principais constituintes do soro e faixas de concentração (adaptado de Freshney, 2000). ^a As concentrações são aproximadas, apenas fornecem uma ordem de magnitude; ^b somente em SFB; ^c somente em soro humano; ^d mais alto em SFB.	31
Tabela 4.1	Resultados de concentração máxima de células ($X_{m\acute{a}x}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{X/glc}$, $Y_{X/gln}$, $Y_{P/X}$, $Y_{NH4/gln}$, $Y_{lac/glc}$ – em frascos T utilizados com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell (Sigma).	54
Tabela 4.2	Resultados de concentração máxima de produto ($P_{m\acute{a}x}$), produtividade volumétrica máxima ($P_{V,m\acute{a}x}$) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{P/glc}$, $Y_{P/gln}$, $Y_{P/X}$ – em frascos T utilizados com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell.	58
Tabela 4.3	Resultados da concentração máxima de células ($X_{m\acute{a}x}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{X/glc}$, $Y_{X/gln}$, $Y_{P/X}$, $Y_{NH4/gln}$, $Y_{lac/glc}$, $Y_{P/glc}$, $Y_{P/gln}$, $Y_{P/X}$ – em frascos T utilizados com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell (Sigma).	63
Tabela 4.4	Resultados da concentração máxima de células ($X_{m\acute{a}x}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{X/glc}$, $Y_{X/gln}$, $Y_{P/X}$, $Y_{NH4/gln}$, $Y_{lac/glc}$, $Y_{P/glc}$, $Y_{P/gln}$, $Y_{P/X}$ – em spinner e em garrafa roller, nas rotações utilizadas para adaptação, com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell (Sigma).	70
Tabela 4.5	Resultados das taxas específicas de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e coeficiente de rendimento de célula em produto ($Y_{P/X}$) nos três sistemas de cultivo que foram utilizados neste trabalho.	72
Tabela 4.6	Resultados das taxas específicas de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e coeficiente de rendimento de célula em produto ($Y_{P/X}$) nos três sistemas de cultivo que foram utilizados neste trabalho.	75
Tabela 4.7	Comparação da produção de anticorpo <i>in vivo</i> (fluido ascítico) e <i>in vitro</i> (sobrenadante de cultivo).	77

RESUMO

Desde o trabalho de Köhler e Milstein (1975), hibridomas tem sido cultivados para obtenção de anticorpos monoclonais com finalidade de uso em pesquisa, diagnóstico e terapia. O método tradicional de obtenção de anticorpos monoclonais em altas concentrações é através de indução de ascite em camundongos. Esta técnica vem sendo substituída por cultivos de hibridomas em altas concentrações celulares. Neste trabalho, foram cultivados hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-dengue tipo 2 em frascos T, garrafas rotatórias (*roller*) e frascos do tipo *spinner*, utilizando-se o meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10%, e o meio comercial livre de soro animal Ex-Cell® TiterHigh™ (Sigma). Ao longo dos diferentes cultivos, foram avaliadas a concentração celular, viabilidade celular e as concentrações de nutrientes (glicose e glutamina), metabólitos (lactato e amônio) e produto (IgG). A partir dos resultados obtidos, foram calculadas as grandezas representativas do metabolismo celular: concentração máxima de células ($X_{máx}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e coeficientes de rendimento de glicose em células ($Y_{X/glc}$), glutamina em células ($Y_{X/gln}$), células em produto ($Y_{P/X}$), glutamina em amônio ($Y_{NH_4/gln}$), glicose em lactato ($Y_{lac/glc}$), glicose em produto ($Y_{P/glc}$) e glutamina em produto ($Y_{P/gln}$). O meio livre de soro mostrou ser capaz de fornecer melhores condições para o crescimento celular (alcançando 4×10^6 céls/mL), mantendo a viabilidade por um período maior de tempo, nos três sistemas de cultivo testados. Quanto à formação de produto, no meio livre de soro, os hibridomas também secretaram altas concentrações de IgG, alcançando níveis de $3 \mu\text{g/mL}$. Os melhores resultados de crescimento e viabilidade celular foram observados em garrafas *roller* a 40 rpm (após adaptação a rotações inferiores) e a produção de IgG foi maior em garrafas *roller* a 16 rpm (também após adaptação a rotações inferiores) e em frascos do tipo *spinner* a 50 rpm (após adaptação a rotações inferiores em garrafas *roller* até 40 rpm). Quando foram comparadas as concentrações de IgG entre os sobrenadantes de cultivo e três amostras de fluido ascítico do mesmo hibridoma, foi observado que o fluido ascítico continha concentrações 10 a 20 vezes maiores que as obtidas nos sobrenadantes de cultivo. Entretanto, como os volumes de sobrenadantes de cultivo são significativamente maiores do que os de fluido ascítico de camundongos, infere-se que é viável a substituição da produção *in vivo* pela obtenção do anticorpo monoclonal estudado neste trabalho em sistemas agitados, utilizando-se meio livre de soro animal. Contudo, sugere-se a condução de experimentos adicionais para confirmação da total viabilidade da obtenção de anticorpos monoclonais anti-dengue tipo 2 *in vitro* utilizando o processo proposto no presente trabalho.

ABSTRACT

Since Köhler and Milstein's work (1975), hybridoma cells have been cultured to obtain monoclonal antibodies for research, diagnostic and therapeutic purposes. The traditional method to obtain high concentrations (5 to 10 mg/mL) of the monoclonal antibodies is the induction of ascite in mice. This technique is being replaced by high cell density cultivations. In this work, hybridoma secreting anti-dengue type 2 monoclonal antibodies were cultivated in T flasks, roller bottles and spinner flasks, using DMEM medium supplemented with fetal bovine serum at 10%, and the commercial serum-free medium Ex-Cell® TiterHigh™ (Sigma). Cell concentration, cell viability, as well as concentration of nutrients (glucose and glutamine), metabolites (lactate and ammonium) and product (IgG) were evaluated along culture time in the different media and culture systems. Based on these data, variables that reflect the cell metabolism were calculated: maximum cell concentration ($X_{m\acute{a}x}$), specific cell growth rate (μ_{exp}), duplication time (t_d), as well as the yield coefficients of glucose to cells ($Y_{X/glc}$), glutamine to cells ($Y_{X/gln}$), cells to product ($Y_{P/X}$), glutamine to ammonium ($Y_{NH_4/gln}$), glucose to lactate ($Y_{lac/glc}$), glucose to product ($Y_{P/glc}$) and glutamine to product ($Y_{P/gln}$). Among the culture media, the serum-free medium showed to provide better conditions for cell growth (reaching 4×10^6 cells/mL), keeping high cell viabilities for a longer period, in all three tested culture systems. Concerning product formation, hybridoma also released high IgG concentrations (3 μ g/mL) in the serum-free medium. Among the culture systems, the best results for cell growth and viability were found in roller bottles at 40 rpm (after adaptation under lower rotation rates) and IgG production was higher in roller bottles at 16 rpm (after adaptation under lower rotation rates) and in spinner flasks at 50 rpm (after adaptation under lower rotation rates in roller bottles, up to 40 rpm). The IgG concentrations ascitic fluid presented concentrations 10 to 20 times higher than those obtained in culture supernatants. However, since the volumes of culture supernatant obtained in relatively simple, small-scale culture systems are significantly higher than those of mice ascitic fluids, the replacement of *in vivo* production for *in vitro* IgG production in stirred systems, using serum-free media, seems to be feasible. Nevertheless, additional experiments should be carried out to confirm the feasibility of switching the production of anti-dengue type 2 monoclonal antibodies for *in vitro* systems, using the process proposed in this work.

1. INTRODUÇÃO

O dengue é uma doença viral infecciosa aguda causada pelo vírus do dengue (DENV), cujas manifestações clínicas podem variar desde uma forma assintomática, como uma febre baixa, até o quadro clínico grave conhecido como dengue hemorrágico, bem como a síndrome de choque do dengue (Premaratna *et al.*, 2007). A sintomatologia mais comum da doença consiste em febre alta, dor de cabeça frontal ou retro-orbital, dor muscular, vômitos e eritema maculopapular. As formas mais graves dos sintomas afetam o processo de coagulação sanguínea, gerando hemorragias, podendo resultar em hipovolemia e colapso do sistema circulatório (Sierra *et al.*, 2007).

O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* e compreende quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Apesar de serem geneticamente distintos, os sorotipos apresentam semelhanças antigênicas que permitem a qualquer um deles desencadear a doença. A infecção por qualquer um dos sorotipos do dengue gera imunidade para este sorotipo por um longo período, mas não protege contra uma infecção desencadeada pelos outros sorotipos. Deste modo, as pessoas que vivem em áreas endêmicas podem ser infectadas com os quatro sorotipos durante seu período de vida (Gubler, 1998).

Os vírus do gênero *Flavivirus* se caracterizam geneticamente por possuírem RNA de fita simples, são revestidos por um capsídeo protéico e este, por sua vez, é coberto por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro, chamada de envelope. O capsídeo é formado por 180 cópias de duas glicoproteínas. Em termos de tamanho, a partícula viral completa possui aproximadamente 50 nm de diâmetro e 10,7 kb (Figura 1.1) (Qi *et al.*, 2008).

A formação do DENV apresenta algumas especificidades. O genoma desses vírus contém uma única *open reading frame* (ORF) que codifica uma poliproteína que é processada durante e após a transcrição, produzindo três proteínas estruturais: do capsídeo (C), da pré-membrana (prM) e do envelope (E). Além disto, a ORF codifica também sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Vários estudos têm revelado que cada sorotipo do DENV é composto de grupamentos (*clusters*) filogeneticamente distintos, os quais têm sido classificados em “genótipos” ou “subtipos”. Cada genótipo é composto de “grupos” ou “*clades*” também filogeneticamente distintos (Lidenbach e Rice, 2001; Gould e Solomon, 2008; King *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2008).

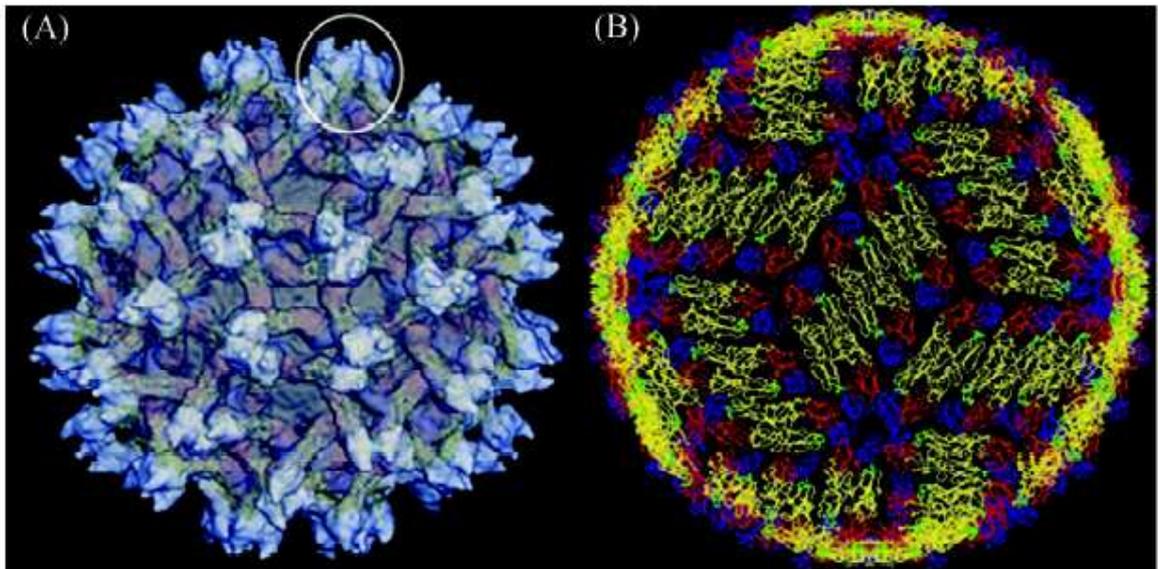


Figura 1.1: O vírus do dengue. (A) Capsídeo: as glicoproteínas formam grupos em forma de ponta (*spikes*, rodeado por um círculo branco), os quais tornam a superfície rugosa. (B) Envelope originado do hospedeiro torna a superfície lisa (modificado de Qi *et al.*, 2008).

O dengue é transmitido de um hospedeiro humano para outro através de um vetor, principalmente o mosquito *Aedes aegypti*, quando este é portador de um dos quatro sorotipos do vírus. Após um período de 10 a 14 dias, contados após o repasto sanguíneo em indivíduo contaminado, o mosquito pode transmitir o vírus do dengue e transportá-lo durante toda a sua vida. O ciclo de transmissão ocorre do seguinte modo: a fêmea do mosquito deposita seus ovos em recipientes com água. Ao saírem dos ovos, as larvas vivem na água por cerca de uma semana. Após este período, transformam-se em mosquitos adultos, prontos para picar as pessoas, disseminando rapidamente a doença. O *Aedes aegypti* procria em velocidades prodigiosas e o mosquito adulto vive em média 45 dias (WHO, 2008).

Considerada atualmente a doença transmitida por mosquito com maior frequência no mundo, mais comum principalmente nos países tropicais e subtropicais, o dengue é responsável pelo registro de 50 milhões de casos anualmente, sendo 500 mil de dengue hemorrágica (Malavige *et al.*, 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente dois-terços da população mundial habitem áreas infestadas pelos vetores do dengue, principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, estando, desta forma, em risco constante de contrair um dos quatro tipos do vírus atualmente em circulação (Keating *et al.*, 2001). É importante destacar que um surto de dengue pode envolver de 70 a 80% da população, o que pode levar a perdas econômicas significativas, visto que uma porcentagem tão elevada de doentes reduz drasticamente a capacidade produtiva de um setor urbano ou rural (Keating, 2001). Outras perdas econômicas estão relacionadas a despesas hospitalares, uma vez que cerca de 500 mil pessoas com dengue hemorrágica requerem hospitalização a

cada ano. Além da população adulta, uma grande parte dos hospitalizados consiste de crianças, sendo, nestes casos, a taxa de mortalidade de 2,5%, envolvendo custos hospitalares adicionais.

No Brasil, o primeiro relato não confirmado de dengue, datado de 1923, foi registrado no estado do Rio de Janeiro, na cidade de Niterói (Veronesi, 1991). Durante os anos seguintes, esta doença não chegou a ser um problema grave de saúde pública. Isto está diretamente ligado ao importante feito, ocorrido na década de 30, de erradicação do *Aedes aegypti*, em ação realizada pelo órgão de saúde pública na época responsável pelo controle da febre amarela, que teve como consequência o controle do dengue (Martins e Castineiras, 2007).

A origem da grande dimensão das epidemias do dengue na atualidade, a ponto de se ter transformado em um problema de saúde pública nacional, tem a seguinte cronologia: o primeiro momento está relacionado com a grande atividade do vírus do dengue no continente americano e com a reinfestação do Brasil pelo vetor *A. aegypti* em 1977, fatos que contribuíram para a reintrodução do vírus do dengue no Brasil nos anos 80. Desde então, mais de 60% dos casos registrados de dengue nas Américas ocorreu no Brasil (Figura 1.2).

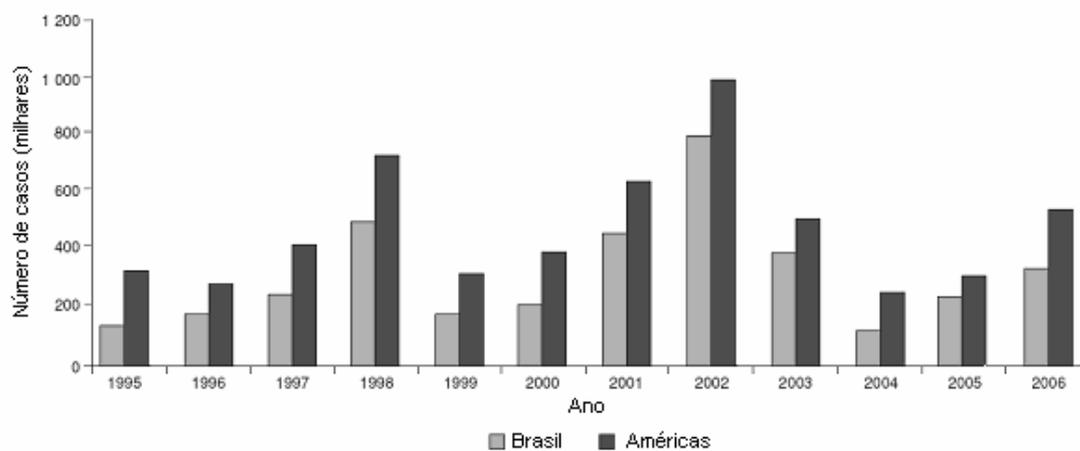


Figura 1.2: Gráfico de dados epidemiológicos do dengue (adaptado de Nogueira *et al.*, 2007).

Em seguida, ocorreu um surto de dengue no período compreendido entre 1981 e 1982, causado pelos sorotipos 1 e 4, na cidade de Boa Vista (Roraima), próximo à fronteira com a Venezuela. Tal surto foi contido por medidas locais de controle de vetores e, durante os quatro anos seguintes, não houve registro de atividade dos vírus no Brasil. A doença voltou a causar grandes transtornos ainda na década de 80. Somente no ano de 1986, o vírus tipo 1 causou um surto no estado do Rio de Janeiro, evento este que determinou o reconhecimento do dengue como um problema de saúde pública de ordem nacional. Outro fator foi determinante para aumentar a gravidade do problema, a dificuldade em implementar o controle adequado do vetor em grandes comunidades urbanas, o que resultou no rápido espalhamento do vírus e no desenvolvimento de epidemias em vários estados. A introdução

do vírus tipo 2 ocorreu em 1990, também no estado do Rio de Janeiro e se dispersou rapidamente para outras regiões do país. Nesta ocasião, ocorreram os casos mais graves da doença e os primeiros óbitos devido a infecções secundárias. Continuando a progressão alarmante da doença, no ano 2000 foi registrada oficialmente a introdução do vírus do tipo 3 no Brasil, causando uma grande epidemia no verão de 2001-2002. Com isto, no final de 2006, os três tipos do vírus do dengue já haviam se espalhado por 25 dos 27 estados brasileiros, causando várias epidemias e um total de 4.243.049 casos registrados em 20 anos (Figueiredo, 2006; Nogueira *et al.*, 2007; Câmara *et al.*, 2007; Degallier *et al.*, 1996).

Atualmente, não existe vacina contra nenhum dos sorotipos do dengue, de forma que a prevenção é a única forma de evitar a disseminação da doença, que só é possível com a quebra da cadeia de transmissão do vírus, eliminando o vetor dos locais onde se reproduzem. Além disso, dados da OMS de 2002 reforçam a importância do diagnóstico mais preciso, pois os mesmos mostram que, sem diagnóstico e tratamento adequados, a taxa de mortalidade pode exceder 20%, enquanto que, com acesso a assistência médica e maiores chances de diagnóstico, esta taxa pode cair a 1%. Estes fatores demonstram que o diagnóstico precoce da doença é essencial para reduzir sua taxa de mortalidade, bem como as implicações sócio-econômicas decorrentes da doença (Kamil *et al.*, 2006; Torres e Castro, 2007).

Recentemente, foi detectado o vírus do tipo 4 na região amazônica, na cidade de Manaus. Esta ocorrência está relacionada à grande incidência deste tipo do vírus nos países que fazem fronteira com o Brasil, como a Venezuela e a Colômbia. Este relato é o primeiro isolamento registrado do sorotipo DENV-4 no Brasil em 25 anos. Tais descobertas reforçam a necessidade de uma vigilância epidemiológica constante e, para tal, os estudos nesta área devem estar associados aos de técnicas de diagnóstico modernas e mais eficientes. Além das técnicas clássicas, devem ser utilizados também ensaios moleculares para o controle adequado de novas epidemias e prevenção do aumento de casos fatais da doença (Medronho, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008; Medronho, 2008).

A metodologia aplicada pelo Ministério da Saúde para detecção precoce da circulação viral e controle de sua disseminação é o diagnóstico laboratorial para detecção de anticorpos anti-dengue presentes no sangue do paciente, utilizando *kits* para ensaios imunoenzimáticos (EIE) (Ministério da Saúde, 2002). A produção dos *kits* para EIE é baseada no clássico ensaio de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura de anticorpos e tem sido, durante muitos anos, o teste sorológico mais largamente utilizado para diagnóstico do dengue. Anticorpos anti-dengue do tipo imunoglobulina M (IgM) desenvolvem-se mais precocemente do que as imunoglobulinas do tipo G (IgG) e, portanto, podem ser detectados nos primeiros dias de manifestação dos sintomas (Gubler, 1998).

A Fiocruz (Biomanguinhos) é um importante produtor de *kits* de diagnóstico para diversas doenças de relevância em saúde pública no Brasil. O *kit* de diagnóstico para DENV-1, DENV-2 e DENV-3 é produzido em seu Departamento de Reativos para Diagnóstico (DERED) e distribuído por Biomanguinhos para a rede de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) de todo o país, especialmente durante os surtos desta doença. A produção do *kit* consiste de um ensaio imunoenzimático (EIE) tipo ELISA sanduíche duplo ou de captura (Figura 1.3). O *kit* é composto por placas de EIE sensibilizadas com anticorpos anti-IgM humanas. O princípio do teste se baseia na reação entre os anticorpos anti-IgM humanas, ligados à fase sólida, e as IgM do soro do paciente, sendo ou não IgM anti-dengue. Na próxima fase do teste, antígenos dos três tipos são incubados e, somente nos orifícios onde há IgM anti-dengue, ocorre a ligação do antígeno específico à doença de que o paciente é portador. Os principais reagentes que compõem o *kit* são os anticorpos monoclonais anti-dengue dos três tipos, os quais fazem parte da próxima fase do teste. Nesta fase, tais anticorpos, conjugados à enzima peroxidase, são então incubados e somente se ligarão naqueles orifícios, onde houver antígenos de um dos sorotipos de dengue ligado ao complexo IgM+anticorpo anti-IgM. O ensaio é então revelado e deverá ocorrer formação de cor somente nos orifícios onde o paciente for portador da doença (Biomanguinhos, 2007). É importante destacar que, por questões de biossegurança, apesar de dispor das células secretoras de anticorpos contra os quatro tipos do vírus do dengue em seus bancos de células, Biomanguinhos produz o *kit* com uma mistura de anticorpos apenas contra os tipos de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, pois, até o momento, não houve nenhum registro da ocorrência do DENV-4 na grande maioria dos estados do país (OPAS, 2007).

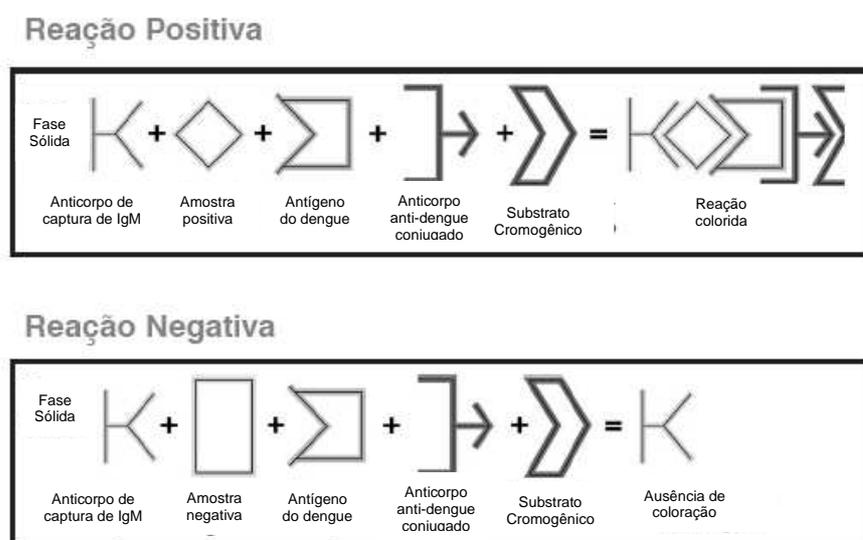


Figura 1.3: Esquema do EIE para diagnóstico de dengue. Adaptado da bula do *kit* fabricado por Biomanguinhos – Fiocruz.

Os anticorpos anti-dengue utilizados por Biomanguinhos foram desenvolvidos no Departamento de Doenças Virais e Bioquímica (*Department of Virus Diseases and Biochemistry*) da instituição *Walter Reed Army Institute of Research* (Washington, D.C., EUA), pela equipe do Dr. Henchal. Após obter os hibridomas secretores desses anticorpos, o instituto os depositou na ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA) em 1982, sob o nº HB-46TM (Gentry *et al.*, 1982; Henchal *et al.*, 1982). Estes anticorpos foram caracterizados como imunoglobulinas do tipo IgG, subtipo IgG₁. Posteriormente, estes anticorpos foram doados a Fundação Oswaldo Cruz, sob os cuidados do Dr. Hermann Schatzmayr, do Instituto Oswaldo Cruz, no início dos anos 90, pela Divisão de Controle de Doenças Infecciosas do CDC (*Center for Disease Control* - EUA). Mais tarde, as células foram cedidas a Biomanguinhos, sob os cuidados do DEREDE e, em 2000, foram transferidas deste departamento para o Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (Latam), pertencente a Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) de Biomanguinhos. O Latam iniciou, neste mesmo ano, os procedimentos de expansão e criopreservação dos hibridomas de dengue, seguindo rigorosamente os protocolos de cultivo e produção descritos por Gentry *et al.* (1982). Após ter o domínio das metodologias de cultivo, o Latam enviou amostras de sua produção de hibridomas para serem submetidos a processo de certificação nas seguintes instituições: Instituto Evandro Chagas do Pará, que constitui o Centro de Referência Nacional de Dengue; LACEN de Pernambuco; Instituto Adolpho Lutz de São Paulo; LACEN do Distrito Federal. Tendo recebido o parecer técnico favorável da Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), o Latam criou o seu próprio banco de hibridomas de dengue para uso corrente no laboratório. Desde então, o Latam tornou-se o responsável por cultivar estes hibridomas, produzir os fluidos contendo os anticorpos e fornecê-los ao DEREDE. No DEREDE, estes produtos são submetidos a processos de purificação e conjugação à peroxidase para posterior produção do *kit* para diagnóstico. Toda a documentação gerada no processo de implantação do banco de células, o certificado de origem das células e os protocolos de cada produção encontram-se no Latam.

Atualmente, o Latam utiliza a técnica tradicional de produção de anticorpos monoclonais *in vivo*, que se baseia na produção de ascite (acúmulo de fluido na cavidade peritoneal) em camundongos da linhagem BALB/c. Esta técnica e suas principais características estão descritas na revisão bibliográfica deste trabalho.

A principal consequência associada ao processo de produção de anticorpos monoclonais pelo método tradicional utilizando camundongos é a impossibilidade de se ter controle adequado do processo. Outros aspectos também são relevantes, tais como as implicações no campo da ética, uma vez que a técnica de produção de anticorpo monoclonal através de

formação de ascite gera sofrimento aos animais, sendo alvo constante de críticas pelas comissões de ética em todo o mundo (Schönherr *et al.*, 1987; Even *et al.*, 2006). Além disso, devem ser consideradas questões da garantia da qualidade em todos os seus aspectos, pois a produção de anticorpos monoclonais através da formação de ascite em camundongos pode não atender às exigências das agências regulatórias para produção de reagentes biológicos devido à impossibilidade de um controle adequado do processo produtivo.

Na tentativa de solucionar as questões abordadas no parágrafo anterior, novas alternativas à técnica tradicional de produção de anticorpos monoclonais em camundongos vêm sendo pesquisadas mundialmente. Cada vez mais, os anticorpos monoclonais vêm sendo produzidos através de cultivo dos hibridomas secretores em sistemas de cultivo *in vitro*, utilizando meios de cultura industrializados. Estas novas metodologias são baseadas na utilização de sistemas mais sofisticados de cultivo, onde os hibridomas alcançam altas concentrações celulares em poucos dias (três a cinco dias) e, por conseguinte, os anticorpos monoclonais chegam a concentrações máximas no sobrenadante de cultura neste período (Bruce *et al.*, 2002). Além disso, o uso dos sistemas de cultivo *in vitro* permite utilizar meios de cultura quimicamente definidos e livres de componentes de origem animal, simplificando significativamente os métodos de purificação do produto.

Nos próximos itens serão abordados assuntos referentes à revisão bibliográfica, onde será dado destaque aos temas relacionados ao desenvolvimento deste trabalho: estrutura, utilização e obtenção de anticorpos monoclonais, sistemas utilizados para o cultivo de hibridomas e o uso de meios de cultivo livres de soro animal.

1.1 Anticorpos Monoclonais

Anticorpos (Ac), ou imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, presentes no plasma, tecidos e secreções que atacam substâncias estranhas ao corpo, chamadas de antígenos, realizando assim, parte importante da defesa do organismo (imunidade humoral).

Monômeros de moléculas de anticorpos são formados por duas cadeias polipeptídicas leves (≈ 25 kDa) e duas pesadas (≈ 50 kDa), as quais se mantêm ligadas através de pontes dissulfeto intercadeias. As cadeias pesadas dos anticorpos são constituídas por um domínio N-terminal variável, diferente de molécula para molécula de anticorpo, seguido por três ou mais domínios constantes. As cadeias leves também são formadas por um domínio N-terminal variável e por apenas um domínio C-terminal constante. A região espacial formada pelos domínios variáveis das cadeias leves e das cadeias pesadas da molécula de Ig constitui o sítio de combinação com o antígeno (Figura 1.4). Assim, cada monômero de imunoglobulina possui dois sítios combinatórios para o antígeno específico, que podem ser microrganismos

patogênicos, substâncias estranhas ou células próprias alteradas, como no caso do câncer. O restante da molécula desempenha as funções efetoras dos anticorpos, que incluem a sua interação com células do sistema imune, através de receptores para Ig, a sua ligação às moléculas do sistema complemento e a sua capacidade de atravessar a placenta ou o epitélio das mucosas (Tamashiro *et al.*, 2008). De acordo com a sequência primária da região constante da cadeia pesada, as moléculas de Ig podem ser classificadas em IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. As imunoglobulinas das classes G e E são secretadas como monômeros, as moléculas IgA como dímeros e as moléculas IgM como pentâmeros. As moléculas IgD nunca são secretadas mas, juntamente com a IgM de membrana (IgM monomérica), constituem os receptores de antígeno (BCR – do inglês, *B cell receptor*) do linfócito B maduro. As moléculas de IgG apresentam subclasses, que variam de espécie para espécie, e no homem são denominadas IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. A IgA também apresenta as subclasses IgA₁ e IgA₂ (Abbas, 2000).

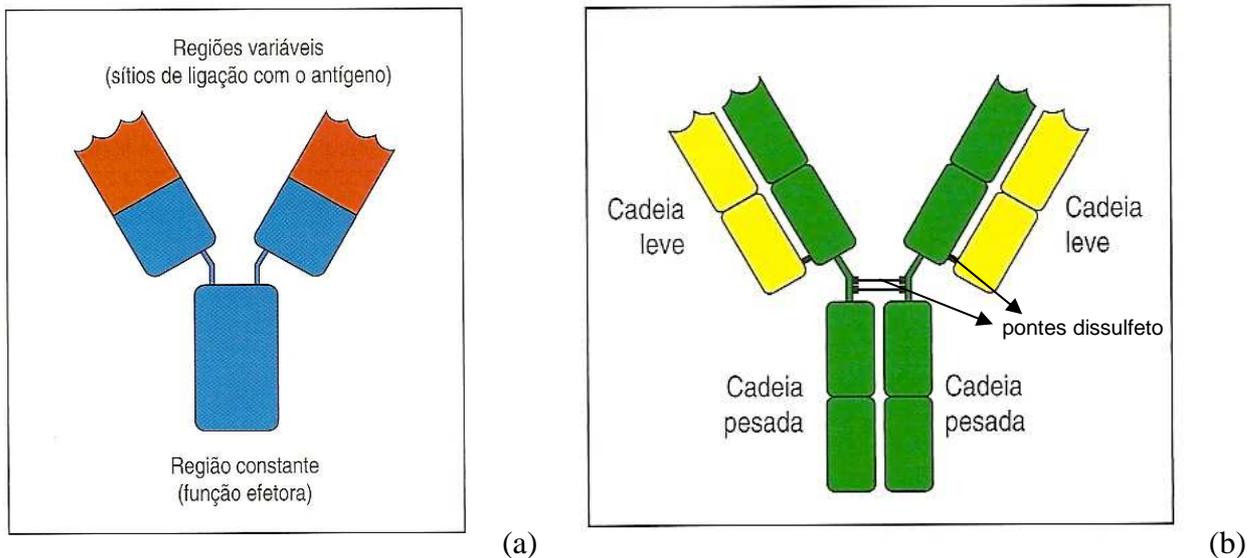


Figura 1.4: Estrutura esquemática da molécula de um anticorpo (imunoglobulina): (a) os dois braços da molécula de anticorpo, em forma de Y, contêm as regiões variáveis (em vermelho), que formam os dois sítios idênticos de ligação com o antígeno; o tronco (em azul) é chamado de região constante; (b) dois tipos de cadeias de uma molécula de anticorpo, a cadeia pesada (em verde) e a leve (em amarelo); há duas cadeias idênticas de cada tipo em cada molécula de anticorpo, ligadas, entre si, por pontes dissulfeto (adaptado de Janeway *et al.*, 2002).

Em cultivo celular *in vitro*, as células plasmáticas não se mostram capazes de proliferar, portanto, não podem ser usadas em métodos *in vitro* para a síntese de anticorpos. Por este motivo, Köhler e Milstein desenvolveram, em 1975, uma técnica que possibilita o crescimento de clones celulares que secretam anticorpos com especificidade definida. Nesta técnica, conhecida como tecnologia de hibridomas, células esplênicas secretoras de anticorpos e incapazes de sobreviver por longo tempo em cultura, são isoladas de um camundongo

BALB/c previamente imunizado, fundidas com células B tumorais (por exemplo, da linhagem SP2/0 Ag14), chamadas mielomas, sendo estas incapazes de secretar anticorpos. Após fundidas, estas células híbridas, ou hibridomas, reúnem características da duas células de origem: são capazes de crescer em cultura por longos períodos de tempo e de secretar anticorpos. Para a seleção de uma única célula do hibridoma (clone) que melhor responde ao antígeno de interesse, os hibridomas são submetidos a um processo de diluição limitante. Os anticorpos produzidos por este clone são chamados de anticorpos monoclonais. Este clone pode ser propagado *in vitro* e continuar secretando os anticorpos de interesse indefinidamente (Figura 1.5) (Tamashiro *et al.*, 2008; Oliveira, 2008). As linhagens destes clones de hibridomas podem ser mantidas em cultura, expandidas e estocadas em nitrogênio líquido para manutenção de um banco de hibridomas (Lonberg, 2005).

Desde o desenvolvimento da tecnologia de hibridomas e dos princípios de produção de anticorpos monoclonais, estas moléculas adquiriram enorme importância e grande versatilidade de uso. São ferramentas altamente específicas, essenciais para detecção e caracterização de estrutura e função de proteínas (Bruce *et al.*, 2002), investigações em imunologia molecular, tornaram-se componentes-chave de uma vasta gama de testes de diagnóstico clínico (Nelson *et al.*, 2000) e, atualmente, anticorpos monoclonais são utilizados para tratamento de diversas doenças (câncer, doenças autoimunes, esclerose múltipla e outras) (Yamashita *et al.*, 2007). Este crescimento das aplicações dos anticorpos monoclonais tornou necessária a obtenção de grandes quantidades de anticorpos com um baixo grau de contaminantes (Bruce *et al.*, 2002; Falkenberg *et al.*, 1995).

Anticorpos monoclonais são ferramentas confirmadamente eficientes para investigação proteômica, com larga aplicabilidade em ciências biomédicas. Estes anticorpos possuem a característica peculiar de serem altamente sensíveis e específicos a seus ligantes (ou receptores, também chamados de antígenos), o que os tornam ideais tanto para o trabalho em pesquisa quanto para o diagnóstico e a terapêutica.

No campo da pesquisa, os monoclonais podem detectar proteínas em células na sua conformação nativa, desnaturada (*western blot*) ou como ligantes de alta afinidade em ensaios de cromatografia de imuno-afinidade. São essenciais para caracterização de estrutura e função de proteínas (Bruce *et al.*, 2002), investigações em imunologia molecular, testes de diagnóstico clínico (Nelson *et al.*, 2000) e purificação de moléculas quando associadas a resinas de vários tipos. Na terapêutica de diversas doenças, tais como câncer, doenças autoimunes, esclerose múltipla e doenças infecciosas, os anticorpos monoclonais possuem vantagens significativas sobre as terapias baseadas em compostos químicos. Devido a sua alta especificidade e afinidade por componentes envolvidos nos processos patológicos, os

monoclonais possuem melhor farmacocinética e reduzida farmacotoxicidade, menos efeitos colaterais, além de serem capazes de recrutar células e moléculas imunes efetoras para iniciar a destruição de seu alvo (Yamashita *et al.*, 2007; Jain e Kumar, 2008; Chiarella e Fazio, 2008).

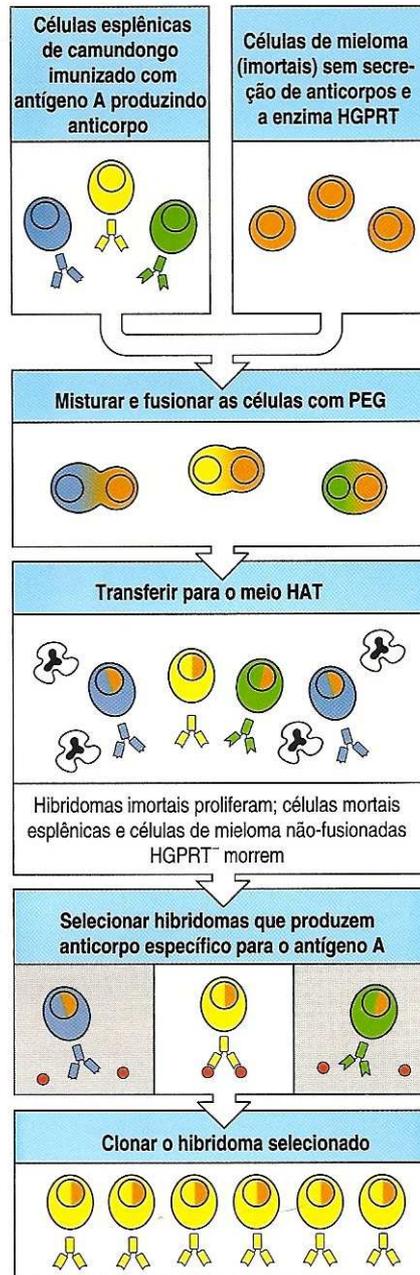


Figura 1.5: Esquema da obtenção e seleção de hibridomas para produção de anticorpos monoclonais (adaptado de Janeway *et al.*, 2002).

Anticorpos monoclonais murinos para uso terapêutico têm seu uso liberado comercialmente desde 1986, mas não mostraram muito sucesso devido à alta imunogenicidade após sua administração e por serem rapidamente eliminados pelo organismo receptor (Morrison *et al.*, 1984). O fenômeno de rejeição dos anticorpos murinos pelos

anticorpos humanos, conhecido como HAMA (*human anti-murine antibody*), decorre do fato de anticorpos murinos serem reconhecidos como antígenos pelo sistema imunológico humano e, portanto, serem rapidamente eliminados da circulação por anticorpos anti-anticorpos murinos, reduzindo os efeitos do tratamento. Consequentemente, são exigidas doses maiores do medicamento, o que aumenta o risco de efeitos indesejáveis. Deste modo, poucos produtos de origem murina foram introduzidos no mercado. O anticorpo monoclonal OKT3, com aplicação na reversão da rejeição aguda de transplantes, permaneceu por muito tempo como único produto terapêutico fruto da tecnologia de hibridomas. Trata-se de um anticorpo anti-CD3 (*cluster of differentiation – 3*) – parte do receptor de membrana de linfócitos T – que permite eliminar temporariamente da circulação os linfócitos T envolvidos no processo de rejeição, possibilitando a aceitação de um órgão transplantado. Por ser um tratamento de curta duração, a resposta imune do paciente contra os antígenos murinos, se existir, será de proporções aceitáveis, o que configura uma situação particularmente propícia ao uso de um produto com essa origem (Tamashiro *et al.*, 2008).

Tentativas foram feitas para aumentar a eficácia dos anticorpos monoclonais no uso terapêutico. A primeira levou ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais quiméricos, nos quais somente o domínio C-terminal constante, ou porção Fc (do inglês, *fragment crystallizable*), é trocada por uma porção humana, diminuindo as reações adversas e aumentando o tempo de residência da molécula no organismo (Morrison *et al.*, 1984; Boulianne *et al.*, 1984; Cole *et al.*, 1984). Estas construções gênicas podem então, ser inseridas em uma célula animal que expressará a proteína de interesse em um sistema de cultivo adequado. Embora esses anticorpos quiméricos ainda apresentem resposta imune HACA (*human anti-chimeric antibody*), esta é de proporção muito menor que a observada no uso de anticorpos completamente murinos, o que possibilitou o sucesso desse tipo de droga em inúmeros tratamentos clínicos (Reichert e Pavlou, 2004).

Outra tentativa de minimizar as reações adversas dos anticorpos monoclonais terapêuticos consiste em criar anticorpos humanizados ou totalmente humanos. Anticorpos humanizados são desenvolvidos através de uma recombinação gênica por enxerto (do inglês, *grafting*), de forma a substituir as regiões determinadoras de complementariedade (CDR – *complementarity determining region*) (Figura 1.6) dos genes humanos pelo equivalente murino, resgatando a especificidade do anticorpo produzido pelo hibridoma, mas preservando 90% das propriedades do anticorpo humano. Cada domínio (VH, porção variável da cadeia pesada, e VL, porção variável da cadeia leve) possui três regiões CDR, que são regiões de hipervariabilidade da molécula de anticorpo, as quais respondem pela afinidade de ligação ao antígeno (Roque *et al.*, 2004). De forma análoga ao que foi descrito para os anticorpos

quiméricos, estas construções gênicas podem ser inseridas em uma célula animal que expressará a proteína de interesse em um sistema de cultivo adequado. Quando comparado com os anticorpos obtidos pela tecnologia de hibridomas, esse tipo de produto geralmente apresenta alguma perda de afinidade, porém com reações adversas de muito menor intensidade (Tamashiro *et al.*, 2008).

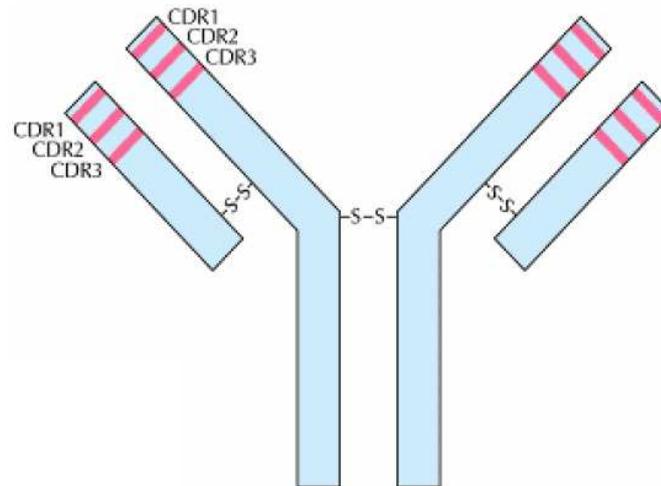


Figura 1.6: Esquema de uma imunoglobulina, destacando as três regiões hipervariáveis: CDR1, 2 e 3 (adaptado de Tamashiro *et al.*, 2008).

A síntese de fragmentos de anticorpos monoclonais humanos a partir de bibliotecas construídas pela técnica de expressão em fagos também tem sido utilizada como método de obtenção de moléculas para uso terapêutico. Reichert *et al.* (2005) analisou a produção de anticorpos monoclonais e observou uma tendência para o estudo de anticorpos monoclonais humanizados e de fragmentos de anticorpos monoclonais. As taxas de aprovação do FDA de anticorpos humanizados e quiméricos estão entre 18 e 29%. Dezoito monoclonais foram aprovados, entre os anos 1996 e 2000, para uso terapêutico. Dentre estes, apenas três são murinos e os outros, humanizados ou quiméricos (Chu e Robinson, 2001; Jain e Kumar, 2008).

A tecnologia de hibridomas ainda é o método mais empregado para gerar anticorpos monoclonais, porém muitos pesquisadores optam por alternativas que sejam mais rápidas e aumentem a produção de anticorpos. Pasqualini e Arap (2004a), por exemplo, criaram a tecnologia de geração de monoclonais sem o uso de hibridomas, a qual consiste em gerar linfócitos imortais como fonte de anticorpos monoclonais, através de camundongos transgênicos. Estes linfócitos imortais apresentaram alta estabilidade genética, mas esta

tecnologia ainda não foi eficiente em diminuir custos e tempo na produção de anticorpos monoclonais.

Avanços recentes no estudo de proteomas ressaltam a alta demanda por anticorpos monoclonais, também chamados de ligantes de alta afinidade. Alguns “gargalos” nas técnicas de produção precisam ainda ser superados para transformar a produção historicamente lenta, cara e intensiva em mão-de-obra em processos mais eficientes para atender adequadamente esta demanda (Chiarella e Fazio, 2008).

Apesar do desenvolvimento, nas últimas décadas, de métodos alternativos para a obtenção de anticorpos monoclonais, como: tecnologia do DNA recombinante e expressão de fragmentos de anticorpos em bactérias (Siegel, 2002), construção de bibliotecas de expressão em fagos (Rader e Barbas 1997), estratégias de quimerização e humanização baseadas em animais transgênicos (Lonberg *et al.* 1994), existe ainda uma demanda crescente por anticorpos monoclonais murinos. Tal demanda tem gerado um aumento significativo na pesquisa de métodos mais eficientes para o desenvolvimento, seleção e produção destes anticorpos.

1.2 Sistemas de Produção de Anticorpos Monoclonais

1.2.1 Produção de anticorpos monoclonais *in vivo*

O método mais tradicional de cultivo dos hibridomas para obtenção de anticorpos monoclonais em altas concentrações consiste basicamente em gerar ascite em camundongos. Para tal, são inoculadas nos camundongos, por via intraperitoneal, células do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal desejado (Potter *et al.*, 1972). Este método induz, nos animais, a formação de tumores ascíticos, em cujo líquido se acumulam quantidades elevadas de anticorpos monoclonais, podendo atingir concentrações de 10 a 20 mg/mL (Falkenberg *et al.*, 1995).

Muitos esforços têm sido feitos para melhorar a produção dos anticorpos monoclonais *in vitro*, com o objetivo de aumentar a concentração de anticorpos, diminuir a quantidade de proteínas contaminantes do sobrenadante e, por conseguinte, reduzir as necessidades de concentração e purificação posteriores. O primeiro passo do procedimento é conhecido como etapa de sensibilização, onde os animais, de aproximadamente seis semanas, recebem injeções por via intra-peritoneal (IP) de reagentes estimulantes da reação inflamatória. O mais comumente usado é a inoculação de 0,5 mL óleo mineral ou de Pristane (Sigma®). Passados 10 dias da sensibilização, os animais são inoculados com 10^6 células de cada hibridoma, também por via IP, para que as células se desenvolvam dentro da cavidade peritoneal no

fluido ascítico. Posteriormente, em aproximadamente 10 dias, o fluido é coletado em três a quatro drenagens, em dias alternados, em cada animal. Após as drenagens, os animais são sacrificados. Como o rendimento de fluido ao final de cada drenagem tende a ser pequeno (cerca de três a cinco mililitros por camundongo) e também com o objetivo de minimizar as diferenças individuais entre os animais, é necessário fazer um *pool* de fluidos obtidos dos camundongos. Em Biomanguinhos, na produção dos anticorpos anti-dengue, este material é centrifugado e aliquoteado para ser entregue ao DERED para produção do *kit* para diagnóstico do dengue.

Esta metodologia de produção de anticorpos monoclonais apresenta uma série de desvantagens, dentre as quais as mais limitantes são:

- ✓ O baixo rendimento, uma vez que quantidades relativamente pequenas de produto são obtidas, apesar da alta concentração de anticorpo no fluido ascítico (5 a 10 mg/mL) (Bruce *et al.*, 2002);
- ✓ O alto custo para a obtenção e a manutenção dos animais em condições adequadas;
- ✓ O alto custo de instalações como biotérios e infectórios;
- ✓ A presença de 10 a 20% de imunoglobulinas não específicas para o antígeno inoculado, as quais acabam por interferir nos ensaios realizados;
- ✓ As falhas na formação de ascite, pois parte dos animais inoculados pode não desenvolver ascite, o que pode causar irregularidades ou inconsistência na produção;
- ✓ O risco de contaminação do produto por provenientes dos camundongos e possíveis patógenos infectantes dos camundongos;
- ✓ A presença de proteínas não específicas dificulta significativamente o processo de purificação dos anticorpos, acarretando em perdas e diluição do produto durante o processo de purificação;
- ✓ Variações significativas que ocorrem na composição entre os fluidos ascíticos desenvolvidos por cada camundongo, o que resulta em variações entre os lotes de anticorpos produzidos (Schönherr *et al.*, 1987; Bruce *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Pelos aspectos destacados acima, a principal consequência associada ao processo de produção de anticorpos monoclonais pelo método tradicional utilizando camundongos é a impossibilidade de se ter controle adequado. Considerando apenas a qualidade do produto e os custos de produção, pode-se dizer que esta metodologia não seria a melhor escolha para uma produção consistente e de grande escala. Além disso, outros aspectos importantes devem ser considerados, tais como as implicações no campo da ética, pois é uma técnica que leva ao sofrimento de animais, sendo alvo constante de críticas pelas comissões de ética em todo o mundo (Even *et al.*, 2006; Schönherr *et al.*, 1987).

1.2.2 Produção de anticorpos monoclonais *in vitro*

Cada vez mais os anticorpos monoclonais vêm sendo produzidos através de cultivo dos hibridomas secretores em sistemas de cultivo *in vitro* (Figura 1.7), utilizando meios de cultura industrializados. Estas inovações são extremamente importantes, pois quando se considera, por exemplo, o cultivo estático em garrafas de poliestireno (frascos T), método como são mantidos os hibridomas tradicionalmente em laboratório, verifica-se que o mesmo resulta em baixas concentrações de anticorpos monoclonais no sobrenadante de cultura (Falkenberg *et al.*, 1995). Desta forma, este tipo de produção não possibilita o cultivo em altas concentrações celulares e também não permite que as células sobrevivam por períodos superiores a uma semana, tornando-se, portanto, inviável a utilização deste sistema para obtenção da quantidade necessária de anticorpos monoclonais para a produção de *kits* de diagnóstico em escala industrial. Vários métodos têm sido desenvolvidos com a intenção de superar as concentrações de anticorpos dos frascos T através do cultivo de células em altas concentrações (Wang *et al.*, 2004). Os sistemas agitados de cultivo de hibridomas consistem uma das alternativas que vêm recebendo destacada atenção nos últimos anos (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000; Legazpi *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007; Jain e Kumar, 2008).

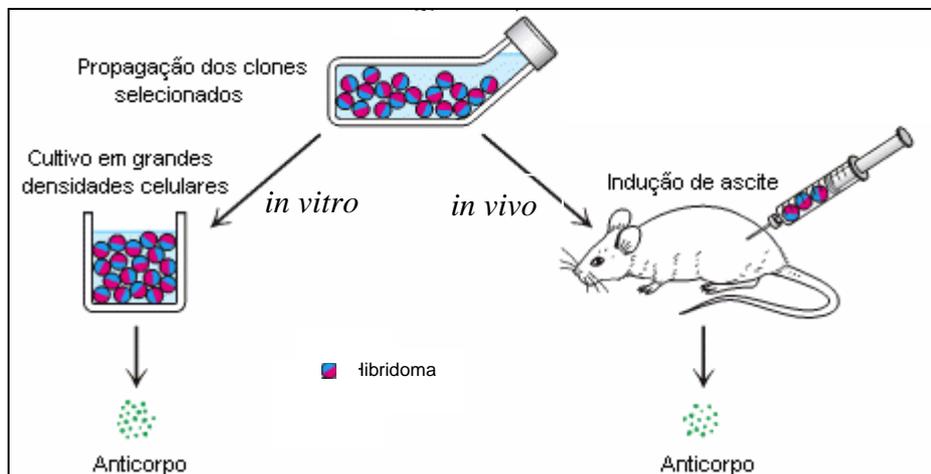


Figura 1.7: Esquema da produção de anticorpos monoclonais *in vivo* e *in vitro* (adaptado de Tamashiro *et al.*, 2008).

A possibilidade de cultivo de células *in vitro* e a necessidade de produção de uma grande variedade de reagentes e fármacos de origem biológica levou à pesquisa de formas de cultivo de células onde as condições físicas, químicas e biológicas possam ser controladas. Desta forma, foram desenvolvidos sistemas de cultivo celular *in vitro* (Davis, 2007; Chico *et al.*, 2008), os quais podem variar em volume de poucos mililitros a vários litros, ser de operação

simples ou possuir controles complexos, além de poder exigir manuseio em câmara de fluxo laminar ou não. Na tentativa de simular o funcionamento de órgãos de seres vivos, foi desenvolvida uma enorme variedade de sistemas, objetivando o cultivo adequado de uma grande variedade de linhagens celulares.

Existem várias classificações dos sistemas de cultivo, mas uma das mais úteis refere-se ao modo como as células estão dispostas no sistema: aderidas ou em suspensão (Davis, 2007). Nos sistemas em que as células crescem aderidas, deve haver um mecanismo que permita ao meio de cultivo estar em contato com todas as células para que elas tenham acesso aos nutrientes e ao oxigênio dissolvido (Chico *et al.*, 2008). Estes sistemas, de modo geral, são estáticos, limitados para escalas de até alguns litros e também não permitem a retirada de amostras homogêneas da população celular durante o processo de cultivo (Chico *et al.*, 2008), exceção quando se cultiva células aderidas a microcarregadores em sistemas agitados. Nos sistemas em que as células crescem em suspensão, procura-se aplicar uma condição em que todos os componentes do cultivo (meio, células, nutrientes, gases dissolvidos e metabólitos) estejam igualmente distribuídos (Legazpi *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007; Jain e Kumar, 2008), sendo necessário que o meio de cultivo esteja em constante movimento. Por este motivo, estes sistemas são também chamados de sistemas agitados.

Para produzir uma grande quantidade de anticorpos monoclonais é necessária uma determinada quantidade de hibridomas. O número de células requeridas dependerá das propriedades das células cultivadas. Hibridomas tipicamente produzem entre 4×10^7 e 7×10^7 moléculas de anticorpo por célula por 24 h (St. Groth, 1983).

Os sistemas para cultivo de células animais devem ser construídos com materiais, como o borossilicato ou o aço inox 316 L, que impeçam ou dificultem a contaminação do produto com resíduos dos mesmos ou a contaminação do cultivo por proliferação de microorganismos. O processo de fabricação destes materiais deve ser registrado para que possam ser certificados e então façam parte do processo de cultivo. Deste modo, todos os materiais devem estar de acordo com as especificações adotadas pelas agências regulatórias do país onde o equipamento é utilizado (ANVISA, 2003; Chico *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Produção de anticorpos monoclonais em sistemas estáticos

O sistema de cultivo *in vitro* mais utilizado em escala laboratorial é o frasco T. Isto se deve principalmente a sua praticidade de uso e baixo custo. Desta forma, frascos T são utilizados praticamente sempre que se trabalha com cultivo de células animais, seja para o cultivo principal, seja para ampliação e preparação de inóculo para outros tipos de frasco ou somente para descongelamento inicial da linhagem celular (Chico *et al.*, 2008).

Frascos T são garrafas de poliestireno com tampas rosqueáveis (ventiladas ou não por filtros hidrofóbicos de 0,22 μm de poro) (Figura 1.8) que são mantidos na horizontal dentro de uma estufa incubadora e que permitem o cultivo de células no volume de meio de cultivo que lhes é adicionado. No caso de cultivo de células aderentes, estas se expandirão sobre a superfície interna inferior da garrafa. A manipulação de cultivos realizados em frascos T deve ser feita sempre em câmara de fluxo laminar, para manutenção da assepsia.



Figura 1.8: Frascos T para cultivo celular em sistema estático (BD Falcon, 2009).

O cultivo estático em frascos T se caracteriza por apresentar rendimento baixo (Falkenberg *et al.*, 1995). Por isso, foram desenvolvidos outros sistemas de cultivo estático com o intuito de aumentar a superfície de adesão e, portanto, a produtividade de células aderentes, assim como outros que tornaram os cultivos mais automatizados e, portanto, menos suscetíveis a contaminações. Dentre os mais utilizados estão: os frascos com superfícies expandidas (Figura 1.9a), as bandejas de cultivo empilháveis *Cell Factory* (Nunc) (Figura 1.9b, c e d) e o biorreator para células aderentes *CellCube* (Corning) (Figura 1.9e). O sistema *Cell Factory* é formado por unidades controladas eletrônica e pneumaticamente para coletar o sobrenadante de cultivo e encher as placas com meio de cultivo fresco. O sistema *Cell Cube* é também controlado por um módulo eletrônico que aciona bombas que retiram o sobrenadante de cultivo e repõem meio de cultivo fresco, de modo a manter todo o cultivo exposto uniformemente aos gases e nutrientes.

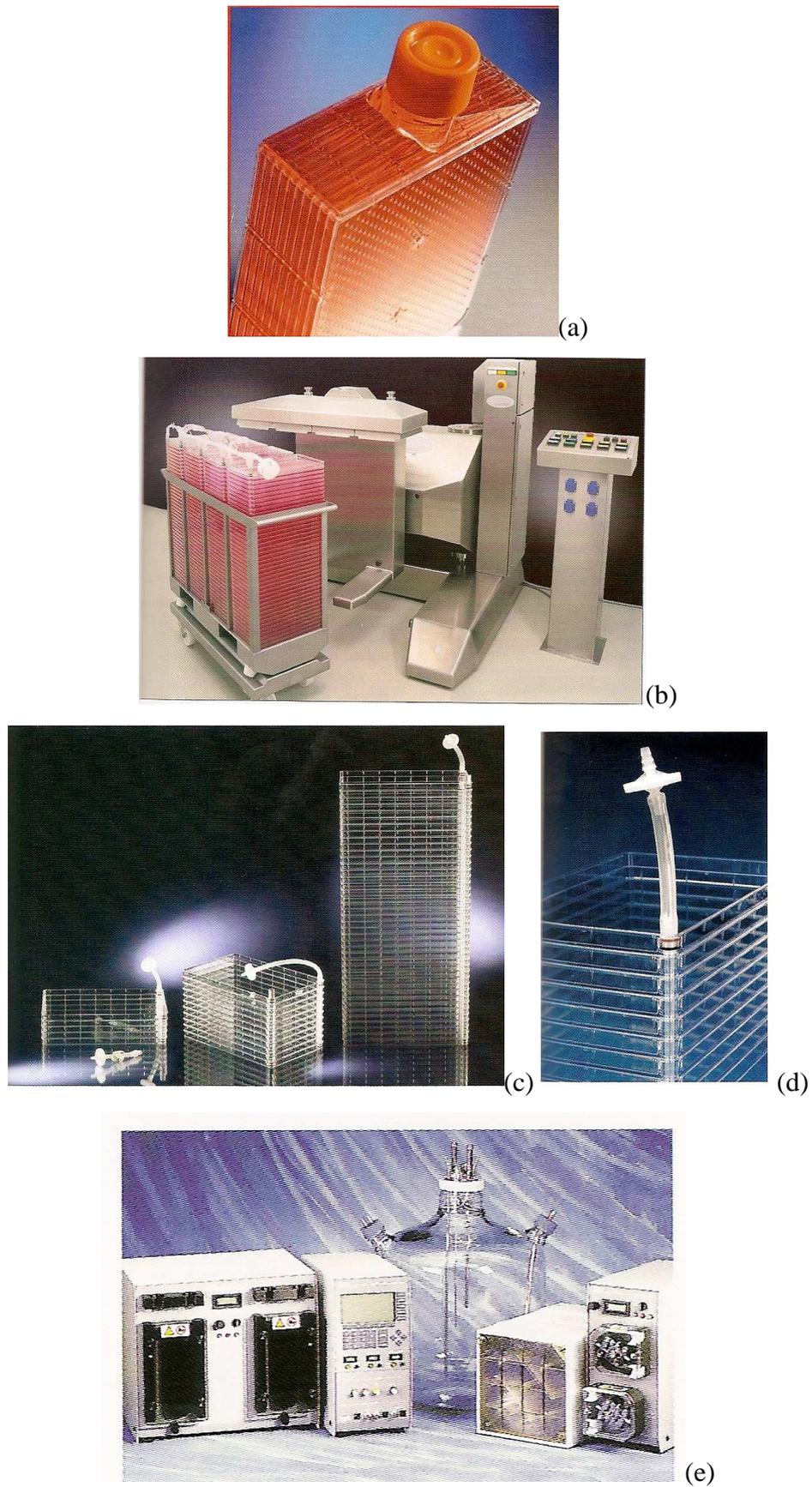


Figura 1.9: Sistemas de cultivo estático com maiores superfícies de adesão (a) frasco T com superfície expandida (Corning, 2007); (b) sistema de cultivo *Cell Factory* (Nunc, 2005); (c) bandejas de cultivo do sistema *Cell Factory* (Nunc, 2005); (d) detalhe do sistema de fluxo de gases sistema de cultivo *Cell Factory* (Nunc, 2005); sistema de cultivo *CellCube* (Corning, 2007).

1.2.2.2 Produção de anticorpos monoclonais em sistemas agitados

Nos sistemas agitados, procura-se aplicar uma condição em que todos os componentes do cultivo (meio, células, nutrientes, gases dissolvidos e metabólitos) estejam igualmente distribuídos em todo volume de cultivo (Legazpi *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007; Jain e Kumar, 2008), sendo, para tal, necessário que o meio de cultivo esteja em constante movimento.

As células de mamíferos caracterizam-se por possuírem crescimento lento, baixa produtividade e alta sensibilidade às limitações de nutrientes, ao acúmulo de metabólitos e às tensões de cisalhamento (devido à ausência de parede celular). Por estes motivos, o cultivo destas células exige um controle rígido de todos os aspectos físicos, químicos e biológicos (Léo *et al.*, 2008; Altamirano *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2008; Pellegrini *et al.*, 2008). A característica homogênea dos sistemas agitados permite que os parâmetros de cultivo possam ser medidos e controlados diretamente durante o seu processo. Desta forma, é possível estimar indiretamente o estado fisiológico das células (Chico *et al.*, 2008). Do mesmo modo, amostras homogêneas de células podem ser coletadas durante o cultivo para avaliação da concentração e da viabilidade celular. Outra característica importante dos sistemas agitados é que os mesmos são mais facilmente escalonáveis para maiores volumes do que os sistemas de células aderentes.

1.2.2.2.1 Garrafas Rotatórias (*roller*)

As garrafas rotatórias, ou garrafas *roller*, são frascos cilíndricos com tampas rosqueáveis (ventiladas ou não por filtros hidrofóbicos de 0,22 μm de poro), que permitem a adesão de células em toda a sua superfície interna, que pode variar de acordo com o tamanho da garrafa ou o tipo de superfície. A mais comumente utilizada possui 850 cm^2 de superfície interna (Figura 1.10a). O volume de meio de cultivo utilizado, entre 300 e 450 mL, é suficiente para banhar apenas uma porção desta superfície, o que é solucionado mantendo-se a garrafa na posição horizontal sobre um aparelho que a mantém sob rotação constante (Figura 1.10b) (Kumar *et al.*, 2004).

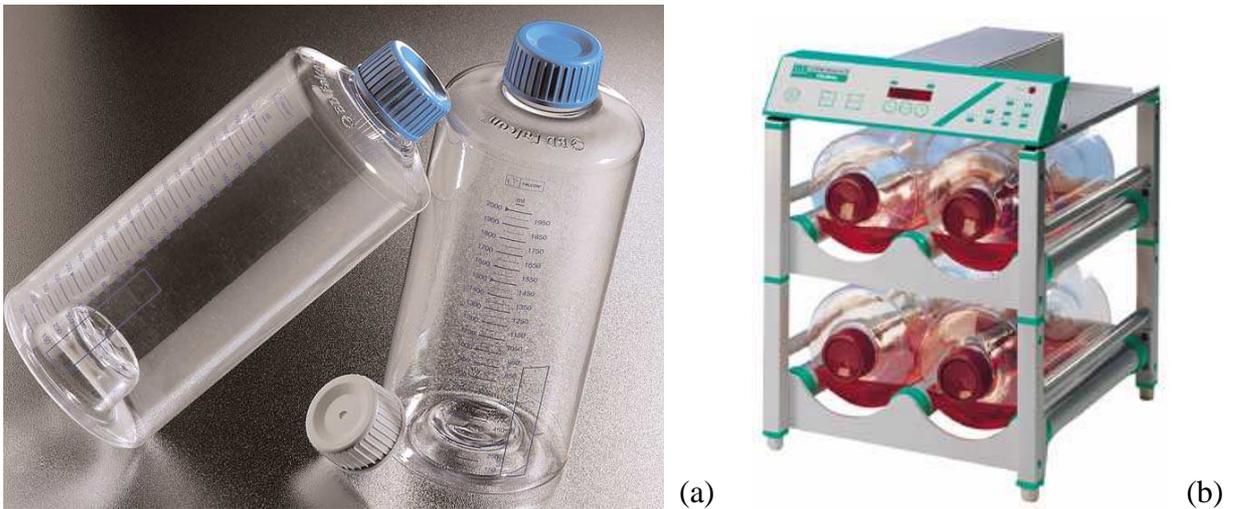


Figura 1.10: Garrafas *roller*. (a) visão geral das garrafas de 850 cm² de superfície interna, como as utilizadas neste trabalho; (b) disposição das garrafas quando em processo de cultivo, sobre o aparelho gerador de rotação (Greiner Bio-One, 2009).

O posicionamento horizontal sobre o sistema de rotação (1-2 rpm) faz com que todas as células sejam periodicamente supridas com nutrientes do meio de cultivo. O sistema de rotação deve ficar em estufa com temperatura controlada (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000; Kumar *et al.*, 2004).

As garrafas *roller* apresentam vantagens como:

- ✓ O uso de pequena quantidade de meio de cultivo, onde se pode obter mais alta concentração de produto;
- ✓ A obtenção de concentrações celulares maiores que em frascos estáticos;
- ✓ A alta oxigenação do meio e, conseqüentemente, das células, devido ao processo de rotação;
- ✓ Na operação de um grande número de garrafas, um caso de contaminação gera perda de apenas uma pequena parte do cultivo (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000).

Já as desvantagens de garrafas *roller* são:

- ✓ Necessitam ser manipuladas em cabines assépticas;
- ✓ Envolvem um custo significativo em equipamentos, quando comparadas aos sistemas de frascos, como incubadoras, agitadores e cabines assépticas;
- ✓ Ser for utilizado um grande número de garrafas, a troca de meio, ampliação e coleta de produto podem se tornar altamente intensivos em mão-de-obra e com maior risco de contaminação devido à manipulação;
- ✓ Geralmente ocorrem perdas de 10 a 20% das garrafas durante o processo (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000).

Garrafas *roller* são os frascos mais frequentemente utilizados para o início do escalonamento de cultivo para células aderentes (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000). Isto não significa que as mesmas não possam ser utilizadas com células em suspensão. Apesar de pouco utilizado, este procedimento pode ser válido para adaptação ao crescimento em suspensão, permitindo o início da adaptação em baixíssimas rotações (por exemplo, 1 rpm) (Tree *et al.*, 2001; Genzel *et al.*, 2006; Hundt *et al.*, 2007; Berson e Friederichs, 2008).

1.2.2.2.2 Frascos agitados do tipo *spinner*

Em geral, o primeiro passo para o escalonamento de células que crescem em suspensão, ou que são adaptadas para crescer em suspensão ou que crescem aderidas a microcarregadores é o frasco agitado do tipo *spinner*. O frasco é normalmente feito de vidro borosilicato e possui, fixado em sua tampa, um eixo que, em sua outra extremidade, possui uma barra magnética coberta de teflon, silicone ou vidro. A barra magnética não deve encostar no fundo do frasco, nem em sua parede, para evitar danos às células (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000; Kumar *et al.*, 2004) (Figura 1.11).

A tampa superior do frasco pode possuir um filtro hidrofóbico que permite a troca de gases entre o cultivo e o ambiente. Costumam também existir mais uma ou duas aberturas (braços), mantidos tampados, que são utilizados para troca de meio, retirada de amostras, introdução do inóculo e outras funções. Todo o sistema, incluindo os frascos *spinner* e o agitador magnético, deve ser mantido dentro de incubadora ou ambiente com temperatura, umidade e atmosfera de CO₂ controlados (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000).

Os frascos agitados do tipo *spinner* possuem vários tamanhos, com volumes úteis variando de poucos mililitros até 20 L. Após a adição do meio de cultivo e do inóculo, o frasco é posicionado sobre um agitador magnético de baixa velocidade. Deste modo, a velocidade de agitação pode ser controlada, mantendo as células em suspensão (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000).

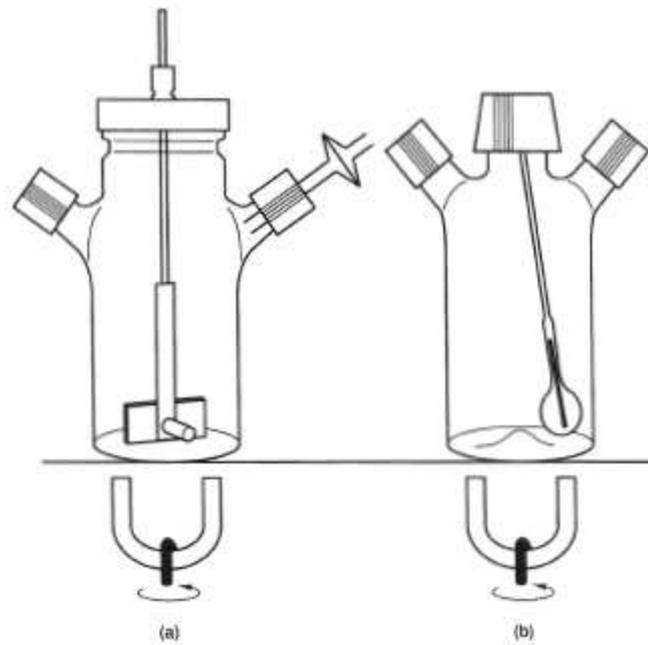


Figura 1.11: Esquema de frascos *spinner*. (a) frasco *spinner* com barra magnética central; (b) frasco *spinner* com barra magnética pendular (Doyle e Griffiths, 2000).

1.2.2.2.3 Biorreatores

Os processos biológicos são de operação complexa, pois sofrem influência de um grande número de variáveis. Estas variáveis e a interação entre elas tornam difícil o controle destes processos, pois as respostas a qualquer mudança no ambiente ou no processo em si são pouco reprodutíveis. Deste modo, o controle de processos biológicos torna-se a maior dificuldade em seu desenvolvimento, otimização e escalonamento. Os diferentes parâmetros de controle que caracterizam os processos de engenharia química nem sempre se aplicam de modo simples nas operações de sistemas biológicos (Sommerfeld e Strube, 2005). Atualmente, o cultivo em biorreatores agitados é o sistema de cultivo celular *in vitro* predominante na indústria, por permitirem o controle e monitoramento constante do processo.

Esta área de pesquisa tem avançado grandemente e muitos novos tipos de biorreatores e modificações têm sido utilizados para alcançar altas concentrações celulares e aumentar a produtividade de processos de produção de anticorpos monoclonais, biofármacos e vacinas. Um projeto adequado de um biorreator deverá permitir: uma transferência de massa eficiente, já que a mesma será necessária para garantir o fornecimento homogêneo de nutrientes e evitar o acúmulo localizado de metabólitos celulares; um suprimento de oxigênio necessário para a concentração celular desejada e baixos níveis de tensão de cisalhamento celular (Glacken *et al.*, 1983).

Diferentes tipos de biorreatores agitados têm sido usados para o cultivo de células de mamíferos, tanto em escala piloto, quanto em escala industrial: biorreator de tanque agitado, biorreator do tipo *air lift*, bioreator de fibras ocas e biorreatores com superfícies permeáveis (Martin e Vermette, 2005; Wang *et al.*, 2005; Warnock e Al-Rubeai, 2006; Chico *et al.*, 2008). A utilização de cada um destes biorreatores apresenta vantagens e desvantagens, sendo adequados para diferentes aplicações.

Biorreatores de tanque agitado

O biorreator de tanque agitado tem sido o mais utilizado na indústria devido a sua facilidade de escalonamento e controle do cultivo (Chu e Robinson, 2001; Birch e Racher, 2006). Já para uso em pequenos volumes, existe uma grande diversidade de tipos de reatores que são empregados em diferentes áreas, tais como: produção de vacinas virais, terapia gênica e diagnóstico (Chu e Robinson, 2001; Jain e Kumar, 2008).

Na produção de anticorpos monoclonais em grande escala, os biorreatores de tanque agitado tem sido largamente utilizados pelas indústrias. Alguns exemplos de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis produzidos por este sistema de cultivo podem ser citados, como o Alemtuzumab, para tratamento de leucemia linfocítica crônica; o Cetuximab, para tratamento de câncer de cabeça, de pescoço e colorretal; o Adalimumab, para tratamento de artrite reumatóide; o Trastuzumab, para tratamento do câncer de mama, dentre outros (Mellado e Castilho, 2008). Tais biorreatores consistem basicamente de um vaso, válvulas e um motor ligado a um eixo de agitação. Os biorreatores de tanque agitado para pequenos volumes geralmente possuem vasos de borosilicato termo-resistente. Já os de grandes volumes são construídos em aço inoxidável polido. De modo geral, impelidores do tipo naval (bordas arredondadas) são usados para manter a cultura em suspensão. Hibridomas costumam resistir a velocidades de agitação relativamente altas (Chisti, 1993), especialmente quando não são necessários mecanismos de aeração, permitindo melhor homogeneização e oxigenação do sistema. É importante destacar o cuidado que se deve ter com as condições de agitação, pois o binômio agitação e aeração, agindo conjuntamente, pode contribuir significativamente para a redução da viabilidade celular (Oh *et al.*, 1992). O dano às células pode ser reduzido significativamente adicionando ao meio de cultivo reagentes protetores da membrana celular, por exemplo: soro albumina bovina (BSA), soro animal, dextrana ou o surfactante não-iônico Pluronic F68 (Chisti, 2000; Sowana *et al.*, 2002; Murhammert e Goochee, 1990).

Podem ser apontadas como vantagens deste tipo de sistema de cultivo: a possibilidade do cultivo de células em suspensão ou aderidas a microcarregadores, o fornecimento de um

ambiente homogêneo para crescimento e proliferação celular e um controle de processo relativamente fácil (Wang *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, tem sido desenvolvidos biorreatores agitados descartáveis para cultivo de células animais e hibridomas, para a obtenção de proteínas recombinantes, vacinas e anticorpos monoclonais. As principais vantagens dos biorreatores descartáveis são: o baixo custo do investimento inicial, custo de operação reduzido, poucas exigências de validação (os materiais descartáveis são validados pelos fabricantes dos mesmos), escalonamento simplificado e baixo risco de contaminação cruzada.

Existem vários exemplos deste tipo de biorreator (Jain e Kumar, 2008), mas dentre os sistemas agitados, um dos mais utilizados atualmente é o tipo *wave*. Basicamente, este biorreator consiste em uma bolsa descartável de polietileno adquirida já estéril, contendo portas para circulação de gases (mantendo a bolsa parcialmente inflada), inóculo, passagem de meio de cultivo, retirada de amostras e coleta de sobrenadante (obtenção do produto). A bolsa é parcialmente preenchida com o meio de cultivo e a sua parte superior fica preenchida de ar. O reator é mantido sobre uma plataforma de agitação e aquecimento que mantém a temperatura do cultivo estável e também mantém a mistura homogênea através de um movimento oscilante, gerando ondas (*waves*) que aumentam a superfície ar-líquido, aumentando significativamente a transferência de oxigênio. A agitação através de ondas permite, portanto, uma boa aeração sem o uso de bolhas, reduzindo o dano às células causado por estas.

Os biorreatores *wave* podem ser utilizados para qualquer célula que sobreviva em suspensão ou que possa ser cultivada em microcarregadores. Atualmente, este sistema pode alcançar escalas de até 1000 L (volume útil de 500 mL), com uma concentração celular superior a 10^7 células/mL (Singh, 1999; Fries *et al.*, 2005; Jain e Kumar, 2008). A obtenção de produto nestes cultivos é similar às obtidas em cultivos em biorreatores de tanque agitado (Knevelman *et al.*, 2002). Biorreatores *wave* podem ser utilizados sob qualquer modo de operação (Ozturk e Palsson, 1991). Tang *et al.* (2007) desenvolveram um biorreator *wave* operado em perfusão, que alcançou altas concentrações celulares e altos níveis de produção de anticorpos (Figura 1.12).

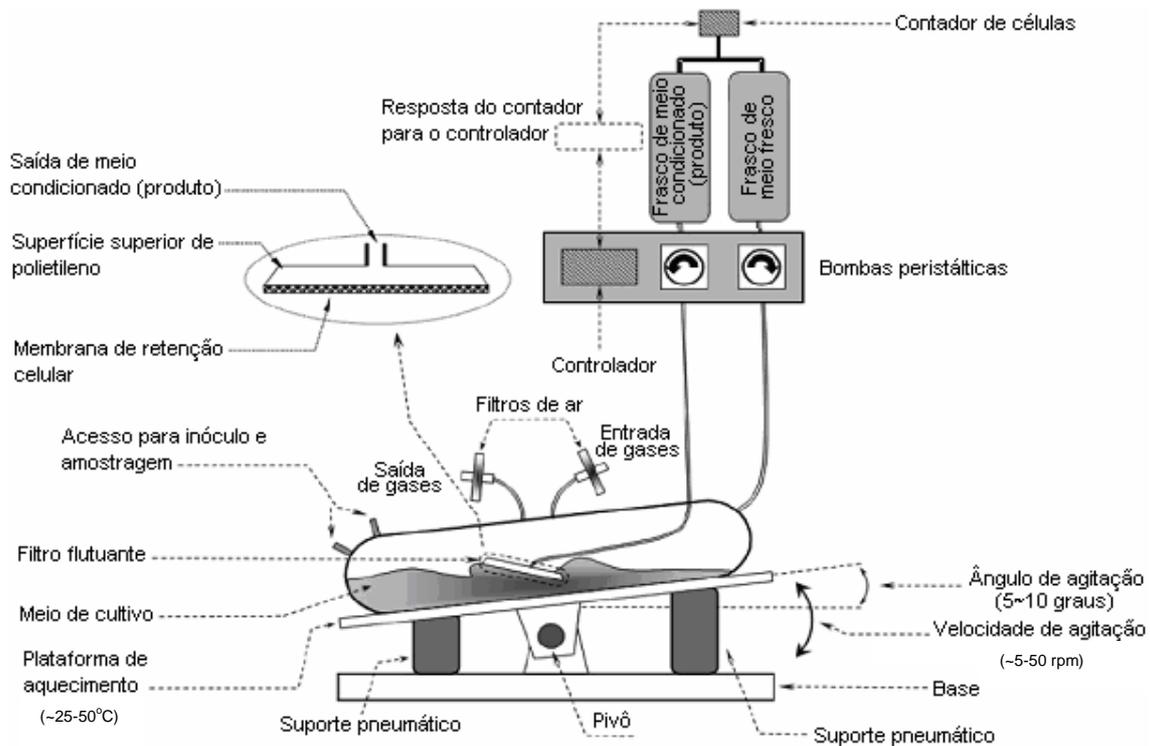


Figura 1.12: Esquema do biorreator *wave* em cultivo contínuo em perfusão (adaptado de Tang *et al.*, 2007).

Biorreatores do tipo *air lift*

Nos biorreatores do tipo *air lift*, o meio de cultivo é agitado, homogeneizado e aerado através da introdução de ar, ou de uma mistura de gases, na base do reator. O biorreator é formado por dois cilindros concêntricos, sendo que o interno recebe os gases e o externo não os recebe. Deste modo, gera-se uma recirculação vertical. Este tipo de biorreator tem sido utilizado frequentemente para produção de anticorpos monoclonais para uso terapêutico e diagnóstico (Bugarski *et al.*, 1989; Kwong *et al.*, 1989; Jain e Kumar, 2008)

Do mesmo modo que os biorreatores de tanque agitado, os do tipo *air lift* podem ser utilizados para cultivar células em suspensão ou aderidas a microcarregadores. Nestes sistemas, as células também podem sofrer danos devido à aeração.

Biorreatores do tipo *air lift* podem ser escalonados até 10.000 litros, produzindo anticorpos monoclonais através do cultivo de hibridomas (Jain e Kumar, 2008). Bugarski *et al.* (1989) cultivou o hibridoma murino secretor do anticorpo neutralizante do vírus AcNPV NOV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis vírus*) em biorreator do tipo *air lift* com 300 mL de volume e produziu aproximadamente 100 µg/mL deste anticorpo.

Biorreatores com membranas permeáveis

A característica comum entre os biorreatores deste tipo é sua divisão em câmaras através de membranas permeáveis. Estas membranas separam câmaras de volumes diferentes: uma menor, contendo as células e o produto secretado diluídos no meio de cultivo, e uma maior, contendo somente meio de cultivo, por exemplo. No lado em que o compartimento menor entra em contato com o ambiente externo, existe uma membrana de silicone permeável a gases, que permite a troca de oxigênio e gás carbônico entre o cultivo e o ambiente. Estes biorreatores são geralmente adequados para escalas de laboratório, pois são de pequenos volumes e podem produzir monoclonais na faixa de 100 a 500 mg (Falkenberg *et al.*, 1995; Trebak *et al.*, 1999), sendo relativamente baratos e fáceis de operar (Figura 1.13).

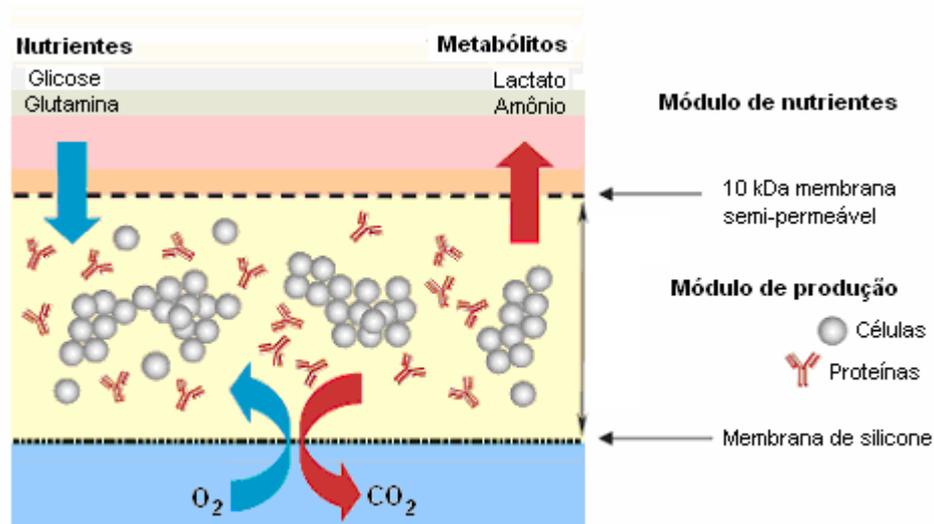


Figura 1.13: Esquema do módulo de produção dos biorreatores com membranas permeáveis, mostrando como ocorre a troca de gases, de nutrientes e de metabólitos (Integra, 2007).

O sistema de cultivo miniPERM (Greiner-BioOne) apresenta as características comuns aos sistemas com membranas permeáveis e, portanto, também possui dois módulos. O módulo superior, autoclavável por até 10 vezes, é chamado de módulo de nutrientes e possui capacidade útil de 400 mL de meio de cultivo. Já o módulo inferior, descartável, é chamado de módulo de produção e possui capacidade útil de 35 mL de suspensão celular. Os módulos são feitos de policarbonato e separados por uma membrana de diálise com massa molar de corte (MWCO) de 12,5 kDa, que permite a passagem de nutrientes e metabólitos e não permite a passagem das células e de produtos de alta massa molar, tais como os anticorpos monoclonais. A membrana de diálise, que separa o módulo de produção do módulo de nutrientes, é suportada por uma grade de policarbonato que, além de protegê-la

contra danos mecânicos, provoca um fluxo do meio de cultivo junto à membrana, melhorando a difusão através da mesma. A membrana de silicone, na outra extremidade do módulo de produção, possui reentrâncias para dentro do módulo que criam turbulências no cultivo, mantendo as células permanentemente em suspensão. Além disto, estas reentrâncias também aumentam a superfície de troca de gases da membrana de silicone (Greiner-BioOne, 2007).

Para que o cultivo mantenha-se em suspensão todo o sistema miniPERM deve ser mantido em rotação. Para tal, o sistema fica sobre um aparelho Universal Turner Device (Greiner-BioOne) com a rotação controlada digitalmente (Figura 1.14). Todo o conjunto deve ser mantido dentro de uma incubadora com temperatura e insuflamento de gases controlados (Greiner-BioOne, 2007).



Figura 1.14: Sistema empregado no cultivo de células no biorreator de superfície permeável MiniPERM.

Biorreatores deste tipo são projetados para cultivos de alta concentração celular (10^7 células/mL ou mais). Culturas estacionárias não são capazes de alcançar concentrações celulares nesta mesma ordem de grandeza devido às limitações na oxigenação do cultivo. Conseqüentemente, os produtos celulares são secretados em maior concentração se comparados a cultivos convencionais estáticos. Por outro lado, uma limitação de cultivos em alta concentração celular é que estes são altamente dependentes de condições ótimas, sendo mais sensíveis a distúrbios do que cultivos em concentrações de 10^5 ou 10^6 células/mL. A alta concentração celular torna-os mais dependentes de suprimento contínuo de altas quantidades de nutrientes e oxigênio e da remoção mais eficiente de metabólitos e CO_2 . A taxa de consumo de oxigênio de hibridomas murinos encontra-se na faixa de 0,05 a $0,1 \mu\text{M}/10^6$ céls/h (Doyle e Griffiths, 1998). Calculando o consumo em uma alta concentração celular

(10^7 céls/mL), a demanda de O_2 em 35 mL de meio de cultivo seria de aproximadamente 17,5 M/h.

Os resultados observados em sistemas permeáveis (de 2 a 4 mg de proteínas/mL) demonstraram que a retenção das células em um compartimento de volume limitado, porém com transferência de nutrientes e oxigênio através de superfícies semi-permeáveis, aumenta a concentração de células e do produto, facilitando sua recuperação e diminuindo a necessidade de concentração. Outro aspecto importante é que estes biorreatores podem funcionar por períodos de vários meses e com concentrações celulares superiores a 10^7 células/mL (Bruce *et al.*, 2002).

1.2.2.3 Modos de operação de sistemas de cultivo

Nas últimas décadas, foi desenvolvida uma ampla variedade de sistemas de cultivo, sendo que muitos deles podem ser utilizados segundo alguns dos modos de operação esquematizados na Figura 1.15. Os sistemas agitados podem ser operados, basicamente, de quatro formas distintas: batelada, batelada alimentada, contínuo simples e em perfusão (contínuo com retenção celular) (Figura 1.15). Tais modos de operação diferem entre si principalmente no que diz respeito à adição ou troca do meio condicionado (sobrenadante de cultivo) por meio fresco determinando, conseqüentemente, o perfil de crescimento celular e a secreção do produto de interesse (Avgerinos *et al.*, 1990).

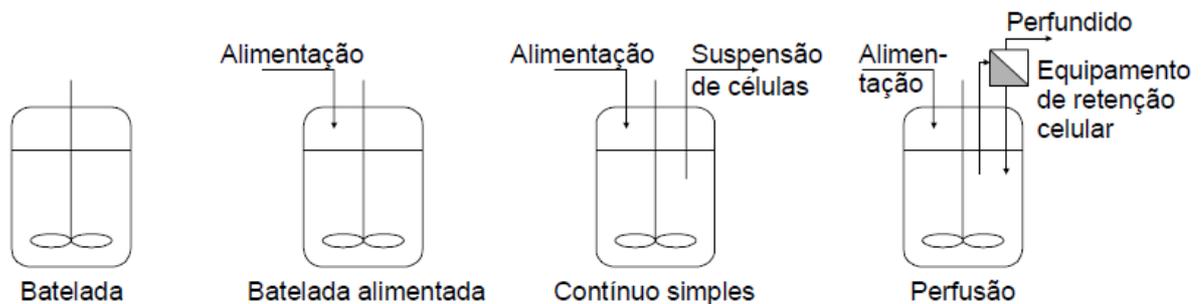


Figura 1.15: Esquemas dos modos de operação de processos de cultivo de células animais (Castilho e Medronho, 2002).

Os modos de operação mais simples tendem a ser os mais utilizados, principalmente em cultivos de pequenos volumes. Já em escala de produção, modos mais complexos podem ser considerados mais produtivos. Ainda não existe uma resposta definitiva para o melhor modo de operação a ser utilizado. Tal escolha dependerá das características da linhagem celular utilizada (perfil de crescimento, padrão de produção, estabilidade de expressão da proteína de interesse, capacidade de resistência às concentrações de metabólitos tóxicos e às tensões de cisalhamento), capacidade do produto de manter sua integridade no sobrenadante de cultura, capacidade de produção necessária para atender à demanda, experiência da equipe no

desenvolvimento do processo, da quantidade de produto desejada, das capacidades do processo de purificação e conhecimento sobre os aspectos regulatórios (Doyle e Griffiths, 1998; Choo *et al.*, 2007; Chico *et al.*, 2008).

Os principais modos de operação de biorreatores estão esquematizados na Figura 1.15 e suas características estão a seguir:

- ✓ **Batelada:** após a introdução do inóculo, não existe nenhum tipo de adição de meio fresco ou retirada de sobrenadante de cultura, sendo de baixa demanda de controle de processo. A duração do cultivo (de 4 a 10 dias) dependerá do inóculo, e da taxa de crescimento e cinética de produção da linhagem celular e costuma ser limitado pela falta de nutrientes e/ou pelo excesso de metabólitos tóxicos (Doyle e Griffiths, 1998; Jain e Kumar, 2008, Chico *et al.*, 2008);
- ✓ **Batelada alimentada:** em períodos determinados, ocorre adição de meio fresco ou de suplementos de nutrientes específicos, sendo também de baixa demanda de controle de processo. Este procedimento aumenta o tempo de cultivo e a concentração celular. Caso o produto tenha meia-vida curta no sobrenadante de cultivo, o fato do tempo de cultivo ser maior pode levar à perda de quantidades significativas do produto. Este modo de operação costuma apresentar maior concentração celular do que obtido na batelada simples e a concentração de produto pode alcançar 750 mg/L (Wurm, 2004; Jain e Kumar, 2008, Chico *et al.*, 2008);
- ✓ **Semi-contínuo:** neste caso, a suspensão celular em um cultivo em batelada é parcialmente drenada em períodos determinados e o mesmo volume de meio fresco é adicionado ao cultivo. Normalmente, este processo pode ser repetido de três a quatro vezes, mas algumas linhagens celulares permitem que sejam feitas até mais de 10 trocas. O número de trocas é limitado pela diminuição da viabilidade celular e pela recuperação de produto a cada drenagem (Doyle e Griffiths, 1998; Jain e Kumar, 2008);
- ✓ **Contínuo:** a suspensão celular é contínua e homogeneamente removida e, do mesmo modo, meio de cultivo fresco é continuamente adicionado. Este processo pode manter as condições de cultivo constantes e o cultivo pode se manter por longos períodos, mas não é considerado economicamente viável para a produção, pois as células nunca alcançam alta concentração celular devido à baixa taxa específica de crescimento, que limita a taxa de diluição, a qual pode ser aplicada sem risco de completa lavagem (remoção completa das células) do biorreator. Este modo de operação é adequado para otimização de obtenção de produto, mas não para produção de biomassa (Jain e Kumar, 2008, Chico *et al.*, 2008);
- ✓ **Contínuo com retenção de biomassa (perfusão):** neste caso, durante o processo contínuo de retirada de meio cultivado e adição de meio fresco, as células são retidas

dentro do biorreator ou devolvidas para este após retenção em equipamento externo. Neste modo de operação, podem ser alcançadas altíssimas concentrações celulares ($>20 \times 10^6$ céls/mL), o cultivo pode ser mantido por períodos maiores (por exemplo, 180 dias) e o produto pode alcançar altas concentrações. Ainda como vantagens, podem ser citados que, neste modo de operação, o tempo de residência do produto no sistema reacional é menor que nos outros modos de operação e maiores concentrações de produto podem ser obtidas com biorreatores de menores volumes. Contudo, é necessária instrumentação complexa para o controle do processo e o entupimento ou falência dos dispositivos de retenção celular no biorreator pode limitar o tempo de cultivo. A taxa de troca de meio, chamada taxa de perfusão, é uma importante variável de operação para sistemas deste tipo. Altas taxas de perfusão aumentam a provisão de nutrientes e podem aumentar a viabilidade celular e a produção da proteína de interesse (Mercille *et al.*, 2000; Ryll *et al.*, 2000; Voisard *et al.*, 2003; Jain e Kumar, 2008, Chico *et al.*, 2008).

1.3 Meios de Cultivo Livres de Soro

O soro animal, especialmente o soro fetal bovino (SFB), vem sendo utilizado há várias décadas como suplemento em cultivos celulares *in vitro*, como fonte de nutrientes, sais minerais, lipídeos e hormônios. Proteínas são os principais componentes do soro e as funções *in vitro* de muitas delas permanecem obscuras. Sabe-se que algumas funcionam como carreadoras de minerais, ácidos graxos e hormônios. Dentre as proteínas mais abundantes e conhecidas presentes no soro, destacam-se a albumina, importante como carreadora de lipídeos, minerais e globulinas; a fibronectina, promotora de adesão celular; e a $\alpha 2$ -macroglobulina, inibidora da ação da tripsina. No SFB, a fetuína e a transferrina também estão presentes - a primeira aumenta a adesão celular e a segunda se liga aos íons de ferro, tornando-os menos tóxicos e biodisponíveis. Outras proteínas, menos estudadas e, portanto, menos caracterizadas, também são essenciais para o crescimento e adesão celular (Tabela 1.1). As proteínas do soro também aumentam a viscosidade do meio de cultivo, reduzindo o estresse causado às células devido à agitação e aumentando a capacidade de tamponamento do meio (Freshney, 2000). Fatores estabilizantes e detoxificantes, também presentes no soro, são necessários para atuar tanto diretamente, mantendo o pH ou inibindo proteases, quanto indiretamente, precipitando proteases ou outras moléculas tóxicas (van der Valk *et al.*, 2004).

Tabela 1.1: Principais constituintes do soro e faixas de concentração (adaptado de Freshney, 2000). ^aAs concentrações são aproximadas, apenas fornecem uma ordem de magnitude; ^bsomente em SFB; ^csomente em soro humano; ^dmais alto em SFB.

Constituintes	Faixa de concentração ^a
Proteínas	40-80 mg/mL
Albumina	20-50 mg/mL
Fetuína ^b	10-20 mg/mL
Fibronectina	1-10 µg/mL
Globulinas	1-15 mg/mL
Inibidores de protease: α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina	0,5-2,5 mg/mL
Transferrina	2-4 mg/mL
Fatores de crescimento	
EGF, PDGF, IGF-1 e 2, FGF, IL-1, IL-6	1-100 ng/mL
Aminoácidos	0,01-1,0 µM
Lipídeos e Ácidos Graxos	2-10 mg/mL
Colesterol	10 µM
Ácidos graxos	0,1-1,0 µM
Ácido linoleico	0,01-0,1 µM
Fosfolipídeos	0,7-3,0 mg/mL
Carboidratos	1,0-2,0 mg/mL
Glicose	0,6-1,2 mg/mL
Hexosamina ^c	6-1,2 mg/mL
Ácido láctico ^d	0,5-2,0 mg/mL
Ácido pirúvico	2-10 µg/mL
Poliaminas	
Putrescina, espermidina	0,1-1,0 µM
Uréia	170-300 µg/mL
Compostos inorgânicos	0,14-0,16 M
Cálcio	4-7 mM
Cloretos	100 µM
Ferro	10-50 µM
Potássio	5-15 mM
Fosfato	2-5 mM
Selênio	0,01 µM
Sódio	135-155 mM
Zinco	0,1-1,0 µM
Hormônios	0,1-200 nM
Hidrocortisona	10-200 nM
Insulina	1-100 ng/mL
Triiodotironina	20 nM
Tiroxina	100 nM
Vitaminas	10 ng-10 µg/mL
Vitamina A	10-100 ng/mL
Folato	5-20 ng/mL

Outros importantes constituintes do soro animal são os fatores de crescimento. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – do inglês, *platelet-derived growth factor*) é um grupo de polipeptídeos com atividade mitogênica e, provavelmente, o fator de crescimento em maior concentração no soro. Outros fatores de crescimento, como os de fibroblastos (FGFs), epidérmico (EGF), endotelial, vascular endotelial (VEGF), angiogenina e similar à insulina (IGF-1 e IGF-2) possuem vários graus de especificidade celular e estão presentes no soro em menores quantidades. Muitos destes fatores de crescimento estão disponíveis comercialmente como formas recombinantes e também em formas análogas como moléculas maiores (Sigma) que possuem sua atividade mitogênica aumentada e maior estabilidade no meio de cultivo (Freshney, 2000).

Os outros elementos do soro ocorrem em concentrações menores, mas alguns deles podem ser de significativa importância para o desenvolvimento do cultivo celular e produção da proteína de interesse. Os hormônios são substâncias que naturalmente atuam em quantidades muito pequenas. Os que mais frequentemente ocorrem no soro são: insulina, que promove entrada de glicose e aminoácidos nas células e tem efeito mitogênico quando ligada ao receptor IGF-1; hormônios de crescimento, que possuem efeito mitogênico; hidrocortisona, que promove adesão e proliferação celular. Determinados compostos podem ser importantes, afetando o metabolismo de algumas linhagens celulares com exigências nutricionais específicas, tais como: nutrientes, como por exemplo glicose, aminoácidos, nucleosídeos, etc.; metabólitos intermediários; lipídeos, normalmente ligados a proteínas, como ácido linoléico, etanolamina e fosfoetanolamina; minerais como o ferro, cobre, zinco e selênio, que normalmente atuam como elementos traço, em baixíssimas quantidades e ligados a proteínas, como co-fatores de enzimas (Freshney, 2000).

O SFB é, normalmente, o suplemento mais escolhido dentre os soros animais, por apresentar menor quantidade de imunoglobulinas, as quais podem atuar como fortes inibidores da proliferação celular e da produção da proteína de interesse, e possuir grande quantidade de hormônios de crescimento e hidrocortisona (Freshney, 2000).

Apesar de todas essas vantagens, os soros animais possuem composição imprecisa, pois seus componentes variam quali- e quantitativamente tanto entre as espécies, o que é esperado, quanto entre cada indivíduo. Deste modo, há a necessidade de fazer *pools* de uma grande quantidade de indivíduos, formando grandes lotes, de modo a uniformizar as concentrações de seus componentes. Tal artifício leva a outro fator limitante: o risco potencial de constituir fonte de contaminação oriunda de algum ou uma parte dos animais doadores. Soro animal pode ser contaminado com bactérias, micoplasmas, vírus ou príons, sendo que alguns podem afetar ou mesmo impedir o crescimento celular, mas outros podem se manter presentes

juntamente com o cultivo, sem afetá-lo visivelmente, mas alterando o metabolismo das células. Este fato torna-se mais importante quando a contaminação afeta a produção da proteína de interesse ou ainda mais sério se contaminações ocorrem em cultivos produtores de fármacos injetáveis, já que alguns microorganismos podem ser transmitidos aos humanos ou animais onde estes fármacos serão utilizados (Freshney, 2000).

Alguns componentes do soro, como alguns dos aminoácidos, proteínas e fatores de crescimento se deterioram ao decorrer do tempo, o que faz com que um mesmo lote de soro não mantenha suas concentrações de componentes durante o período em que está em estoque (Freshney, 2000).

Somente a variação entre lotes já é suficiente para alterar uma produção industrial que trabalhe com enormes quantidades de meio, sendo possível que ocorram variações significativas na obtenção do produto (Freshney, 2000).

Tais desvantagens do soro animal geraram inúmeros esforços em criar formulações de meios de cultivo celular que não necessitassem da suplementação com soro. Inicialmente, as quantidades de soro foram reduzidas até que algumas formulações mostraram que as células eram capazes de se desenvolver no meio sem soro, sendo que algumas linhagens sem adaptação aparente (Tharakan *et al.*, 1986; Freshney, 2000).

Apenas poucos anos após ser descrita a técnica de hibridização para produção de anticorpos monoclonais (Köhler e Milstein, 1975), foram descritas na literatura tentativas de desenvolvimento de meios livres de soro para o cultivo de hibridomas (Chang *et al.*, 1980). Inicialmente, a maioria destas formulações continha outros suplementos protéicos, como insulina, transferrina e albumina (Darfler, 1990; Freshney, 2000; Birch e Racher, 2006). A descoberta de substâncias promotoras do crescimento resultou no estabelecimento de suplementos nutricionais efetivamente capazes de substituir o soro no meio de cultivo. Os meios sem soro podem ser classificados em três tipos: meios quimicamente definidos e livres de proteínas (*protein-free*), meios quimicamente definidos, porém contendo suplementos protéicos (*low-protein*) e meios suplementados com componentes não totalmente definidos quimicamente, tais como leite, extrato de levedura, peptona, etc. (Federspiel *et al.*, 1991; Birch e Racher, 2006).

Muitos pesquisadores foram relutantes em mudar de seu sistema já estabelecido de meio de cultivo suplementado com soro devido à preocupação com os resultados, em termos de produtividade. Entretanto, como o suprimento de soro animal representa um gasto significativo, muitos laboratórios decidiram dedicar esforços a desenvolver meios livres de soro. Os resultados iniciais não foram muito promissores e alguns derivados do soro necessitaram ser ainda usados nos cultivos. Contudo, investigações subsequentes mostraram

que, com os suplementos adequados requeridos pelas várias linhagens celulares, meios livres de soro podem manter normalmente o cultivo celular (Stacey e Davis, 2007). Além disso, devido aos riscos de contaminação do produto para uso em humanos por vírus, micoplasmas ou príons advindos de suplementos de origem animal (Butler *et al.*, 2000; Lubiniecki, 1998), agências regulatórias na Europa (European Medicines Agency: EMEA) e nos Estados Unidos (Food and Drug Administration: FDA) tem encorajado os fabricantes de biofármacos e imunobiológicos a reduzirem ou eliminarem o uso de substâncias de origem animal em seus processos de fabricação (Kallel *et al.*, 2002).

Os meios livres de soro contêm uma série de componentes que formam misturas complexas de sais, aminoácidos, vitaminas, glicose, ácidos nucléicos, precursores lipídicos, antioxidantes e elementos traço. Nos meios que contêm proteínas, são utilizados como suplementos hormônios (insulina, esteróides e fatores de crescimento) e proteínas de adesão e transporte (transferrina e albumina) (Mariani *et al.*, 1991).

Mariani *et al.* (1991) demonstraram que várias linhagens de hibridomas cresceram em meio livre de soro e de proteínas após adaptação e mantiveram seus níveis de produção de anticorpos. Além do avanço na pesquisa de sistemas de cultivo, muito do aumento de produtividade tem sido alcançado devido às otimizações de meio de cultivo e controle de processo (Wurm, 2004; Birch e Racher, 2006; Jain e Kumar, 2008).

Meios quimicamente definidos podem ser menos dispendiosos e tornam o processo de purificação significativamente mais simples, pois possuem menos contaminantes e os poucos existentes são conhecidos, o que facilita o processo. Este aspecto também contribui para tornar mais econômico o uso de meios quimicamente definidos (Schlaeger *et al.*, 1985; Tharakan *et al.*, 1986; Schneider e Lavoix, 1990; Scharfenberg e Wagner, 1995; Birch e Racher, 2006).

O uso de meios quimicamente definidos também facilita a otimização do processo de cultivo, pois torna possível acompanhar mais detalhadamente o metabolismo e a fisiologia celular através de alterações na composição dos nutrientes e suplementos e observar o resultado em termos de crescimento e viabilidade celular, produção de metabólitos e de produto (Schlaeger *et al.*, 1985; Tharakan *et al.*, 1986; Schneider e Lavoix, 1990; Birch e Racher, 2006). Por exemplo, estudos tem mostrado que o fornecimento controlado de glicose e glutamina conjuntamente, no meio de cultivo para células de mamíferos, reduz a produção das duas principais substâncias inibidoras do crescimento – lactato e amônia – sem reduzir a taxa de crescimento (Dorka *et al.*, 2009).

O crescimento dos hibridomas, como o de muitas células de mamíferos, é sensível às condições de cultivo, especialmente às concentrações de nutrientes e metabólitos, sendo

lactato e amônio os dois principais metabólitos tóxicos formados. O cultivo celular e a produção de anticorpos podem ser limitados pela falta de nutrientes, como glicose e glutamina. De forma inversa, níveis altos de metabólitos inibitórios, como lactato e amônio, produzidos pelo próprio metabolismo das células durante seu desenvolvimento em cultura, podem ser tóxicos para as células, levando-as à morte (Hassell *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2001; Butler, 2005). As concentrações destes metabólitos aumentam com o tempo de cultivo e a concentração celular, podendo causar morte celular (Glacken *et al.*, 1986; Wohlpart *et al.*, 1990; Xie e Wang 1997) e redução de produtividade (secreção de anticorpos monoclonais), caso não sejam removidos do sobrenadante de cultura (Çayl *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2007). Um sistema de cultivo que permita solucionar estes aspectos, sem que sejam retiradas células do cultivo, possibilitaria a otimização do processo de produção de anticorpos monoclonais (Butler, 2005).

Meios de cultivo livres de proteínas são frequentemente usados no cultivo industrial de linhagens celulares, tais como CHO e NS0. Estes meios estão disponíveis comercialmente, mas suas formulações são normalmente sigilosas, somente conhecidas completamente pelo fabricante e detentor da patente. Meios de formulação conhecida e livres de proteínas de origem animal ainda melhoram a reprodutibilidade de cada lote e permitem a utilização dos anticorpos para fins terapêuticos, pois, por serem fonte potencial de contaminação, as agências regulatórias tem encorajado seu uso nestes processos de fabricação (Schlaeger *et al.*, 1985; Tharakan *et al.*, 1986; Schneider e Lavoix, 1990; Kallel *et al.*, 2002; Birch e Racher, 2006; Pohlscheidt *et al.*, 2008).

Outra vantagem dos meios de cultivo livres de soro e proteínas de origem animal é a menor possibilidade de formação de espuma devido à baixa quantidade de proteínas (Birch e Racher, 2006).

É ainda importante ressaltar que a otimização efetiva de nutrientes para um meio de cultivo para aplicação na produção de biofármacos pode não estar focada exclusivamente na composição bioquímica. É necessário integrar a formulação com a otimização do processo por completo, incluindo a linhagem celular, o biorreator, a aplicação do produto, a purificação, assuntos regulatórios e perspectivas de resultados em termos técnicos e econômicos (Stacey e Davis, 2007).

Existe, atualmente, uma enorme quantidade de meios livres de soro ou totalmente livres de componentes de origem animal, produzidos por uma série de fabricantes. Alguns dos meios livres de soro mais utilizados são os da linha Ex-Cell (Sigma-Aldrich). Vários autores têm trabalhado com cultivos de várias linhagens celulares, encontrando resultados positivos de crescimento celular e secreção de produto, até mesmo maiores do que os encontrados nos

meios com soro (Kallel *et al.*, 2002; Pasqualini e Arap, 2004b; Genzel *et al.*, 2006). Esta linha de meios possui formulações com baixas concentrações de proteínas recombinantes, tais como insulina bovina, albumina bovina e transferrina humana ou formulações totalmente isentas de proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar a produção do anticorpo anti-dengue tipo 2 utilizado no *kit* de diagnóstico para dengue produzido em Biomanguinhos através do cultivo do hibridoma secretor (New Guinea C – 3H5-1-21 – ATCC nº HB-46) em sistemas de cultivo *in vitro*, utilizando meio de cultivo livre de soro animal.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- 1) Realizar a adaptação dos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-dengue tipo 2 ao crescimento em suspensão em garrafas *roller* e em frascos agitados do tipo *spinner*;
- 2) Realizar a adaptação desses hibridomas ao meio de cultivo sem adição de soro fetal bovino;
- 3) Avaliar variáveis relacionadas à cinética de crescimento celular e ao metabolismo de nutrientes (glicose e glutamina) e de sub-produtos tóxicos (lactato e amônio) nos cultivos *in vitro*;
- 4) Avaliar a produção de anticorpos monoclonais anti-dengue tipo 2, comparando o cultivo de seus hibridomas secretores em cultivo estático, em sistemas agitados e *in vivo*, em termos de formação de produto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, são apresentados os principais materiais e a metodologia utilizados neste trabalho para estabelecer as condições de cultivo da linhagem do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em sistemas agitados, tanto em meio de cultivo contendo soro, como em meio de cultivo comercial livre de soro fetal bovino.

Também são apresentados os métodos analíticos empregados na quantificação das células, nutrientes, anticorpo monoclonal e metabólitos nos cultivos.

3.1 Material

3.1.1 Linhagem celular

Neste trabalho, foi utilizado o hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 (New Guinea C – 3H5-1-21 – ATCC nº HB-46), pertencente ao banco de trabalho do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (Latam) de Biomanguinhos – Fiocruz (Rio de Janeiro/RJ).

3.1.2 Meios de cultivo

Dois meios de cultivo foram utilizados neste trabalho: um meio básico suplementado com soro fetal bovino (DMEM suplementado com 10% de SFB) e outro comercial, formulado especialmente para o cultivo de hibridomas, totalmente isento de soro (Ex-Cell para hibridomas).

3.1.2.1 Meio de cultivo suplementado com soro

O meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, nº. 31600-034) é o meio de cultivo utilizado rotineiramente no Latam para cultivo das células do banco de hibridomas, o qual contém 1 g/L de D-glucose, 110 mg/L de piruvato de sódio, 584 g/L de L-glutamina e 4 g/L piridoxina (vitamina B6). Este meio foi adquirido em forma de pó e preparado com água coletada em aparelho de purificação Milli-Q (Millipore). No momento de sua preparação, o meio foi suplementado com 1,5% de solução de glutamina (Sigma, nº G3126) a 200 mM, 10 % de soro fetal bovino (Gibco, nº 16140-071), insulina (Sigma, nº I1884, preparada conforme a bula do fabricante), 1,5% de tampão HEPES (Sigma, nº H4034) a 1 M, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Merck), 1,5% de solução germicida (penicilina – 10000 U, estreptomicina – 10 mg e anfotericina – 25 µg; Sigma, nº A5955) e 0,03 % de solução de 2-mercaptoetanol (Sigma, nº M6250) a 5%.

Após o preparo, o meio DMEM foi esterilizado por filtração em membrana (Millipore Durapore™) de tamanho de poro igual a 0,22 µm, envasado em frascos de borosilicato de 250 mL em alíquotas de 200 mL e armazenado a 4°C. Durante o processo de filtração, são retiradas três amostras para teste de esterilidade, a ser realizado no Laboratório de Controle Microbiológico (Lacom – Biomanguinhos).

Após aprovação no teste de esterilidade, o meio foi então conservado a -20° C por até 3 meses. Para uso, o meio foi descongelado e, caso a alíquota não tenha sido totalmente utilizada, o frasco foi conservado a 4° C por, no máximo, 15 dias, para evitar degradação da glutamina.

3.1.2.2 Meio de cultivo livre de soro

O meio de cultivo EX-CELL® TiterHigh™ (Sigma-Aldrich, nº I5408) consiste em um meio de cultivo totalmente livre de soro, fabricado sem nenhum componente de origem animal, indicado para o cultivo de hibridomas, proporcionando altas taxas de crescimento celular e altas concentrações celulares, mantendo sua viabilidade. Sua formulação líquida e estéril, pronta para uso, contém sais inorgânicos, bicarbonato de sódio, aminoácidos essenciais e não-essenciais, vitaminas, extrato de levedura, lipídeos, elementos traço e outros compostos orgânicos. No momento da utilização foi adicionada glutamina (10 mM), segundo as instruções do fabricante, além de 1,5% da mesma solução germicida usada no meio DMEM.

3.1.3 Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados no preparo dos meios e soluções necessárias para realização dos experimentos deste trabalho:

- ✓ Soro fetal bovino da marca Gibco (nº 16140-071), que sempre era submetido ao processo de inativação por calor em banho de água a 56°C por um período de 30 minutos;
- ✓ Corante azul de trypan P.A. da marca Applichem GmbH (C.I. 23850). Este corante foi utilizado de forma diluída a 0,5% (p/v) em solução de NaCl 154 mM;
- ✓ Todos os demais reagentes para o preparo de soluções e tampões foram de grau analítico.

3.2 Sistemas de Cultivo

3.2.1 Frascos de cultivo estático

Frascos de cultivo estático (frascos T) de 75 cm² com tampas ventiladas (Corning) foram utilizados para manutenção celular e para padronizar as condições iniciais de cultivo do hibridoma e formação do anticorpo monoclonal.

3.2.2 Garrafas Rotatórias

Garrafas rotatórias do tipo *roller bottles* (Greiner Bio-One), com 850 cm² de superfície interna e com tampas adaptadas com filtro hidrofóbico de 0,22 µm para permitir a ventilação do ambiente, foram utilizadas para o cultivo do hibridoma anti-dengue 2 em sistemas agitados. Para a rotação dos frascos, foi utilizado um aparelho Universal *Turner Device* (Greiner Bio-One) com controle digital da velocidade de rotação e todo o sistema foi instalado dentro de incubadora, mantida a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa (Figura 3.1 a e b).

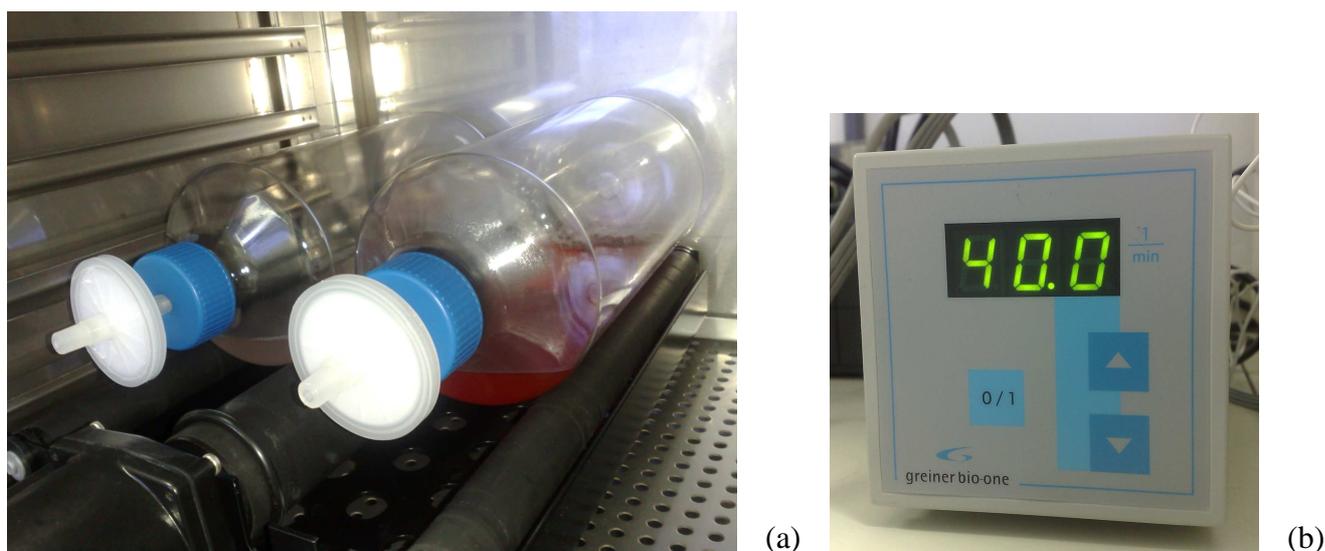


Figura 3.1: Sistema de rotação das garrafas *roller*: (a) visão do sistema de rotação dentro da incubadora; (b) visão frontal do aparelho de controle digital de rotação.

3.2.3 Frascos do tipo *spinner*

Frascos agitados do tipo *spinner*, com volume nominal de 250 mL, foram utilizados para crescimento dos hibridomas. Para agitação dos frascos, foi utilizado um agitador magnético múltiplo com controle da agitação, o qual foi instalado em uma estufa, cuja temperatura foi mantida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Na Figura 3.2, é apresentada uma foto do sistema utilizado nos experimentos com frascos agitados do tipo *spinner*.



Figura 3.2: Sistema empregado no cultivo do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em frascos agitados do tipo *spinner*.

3.3 Metodologia Experimental

Os procedimentos experimentais para o cultivo do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em sistema estático e, posteriormente, em sistemas agitados, empregando meios de cultivo com e sem soro, são apresentados nesta seção.

3.3.1 Estoque celular

O estoque celular realizado para formação do lote de trabalho foi estabelecido da seguinte forma: a partir de um criotubo obtido do banco de hibridomas do Latam, as células foram descongeladas, retirando-se o criotubo do tanque de nitrogênio líquido e levando-o rapidamente a um banho de água a 37°C. Após descongelamento, a suspensão celular foi homogeneizada, transferida para um tubo cônico contendo 10 mL de meio de cultivo DMEM aquecido a 37°C, e submetida à centrifugação a 190 xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado para remoção do meio de congelamento e as células presentes no sedimento foram ressuspensas em 10 mL de meio DMEM. Esta suspensão celular foi transferida para um frasco T de poliestireno de 25 cm² e o cultivo mantido a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para a proliferação celular.

Após 4 a 5 dias de cultivo, as células foram homogeneizadas no meio de cultivo através de suaves batidas do frasco T na palma da mão e, posteriormente, com o uso de uma pipeta. A

suspensão de células foi então dividida em três partes e inoculada em três frascos T de 75 cm² nas mesmas condições anteriores. O processo foi repetido até obter-se uma quantidade de células suficientes para ser dividida em aproximadamente 30 criotubos com 1×10^7 células cada.

As suspensões celulares do cultivo de 12 frascos T de 75 cm² foram transferidas para tubos cônicos e submetidas à centrifugação a 190 xg por 10 minutos. Após descarte dos sobrenadantes, as células foram ressuspensas em meio DMEM, acrescido de 50% (v/v) de soro fetal bovino e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, nº D5879) como crioprotetor, para obtenção de uma concentração de 1×10^7 células/mL. Alíquotas de 1 mL foram distribuídas em criotubos e congeladas lentamente através do seguinte procedimento: os criotubos foram envolvidos individualmente em gaze, mantidos na vertical e colocados inicialmente a -10°C durante meia hora, em seguida a -20°C durante 2 horas e posteriormente a -70°C durante 48 horas. Após este período, os criotubos foram levados para o tanque de nitrogênio líquido a -196°C, onde foram estocados. Após 48 horas no tanque de nitrogênio líquido, três dos criotubos foram retirados aleatoriamente, descongelados, e as células cultivadas para verificação de sua viabilidade e aprovação do lote. A viabilidade média dos três frascos T foi de 89%. Todas as células utilizadas nos experimentos deste trabalho são originadas deste lote de congelamento.

A cada experimento deste trabalho, foi realizado o descongelamento de um criotubo do estoque, conforme descrito acima, e realizada a proliferação celular para uso nos cultivos experimentais.

3.3.2 Crescimento celular

3.3.2.1 Propagação das células em sistema estático

Os hibridomas foram propagados em monocamada utilizando frascos estáticos para cultivo celular e mantidos a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após o estabelecimento de uma monocamada confluenta (aproximadamente cinco dias), as células foram homogeneizadas no meio de cultivo, centrifugadas a 190 xg por 10 minutos, ressuspensas em meio de cultivo, contadas, e um volume adequado da suspensão celular foi utilizado como inóculo. Novos frascos estáticos de cultura, bem como os frascos agitados do tipo *spinner* ou as garrafas rotatórias do tipo *roller* foram inoculados com 2×10^5 células/mL.

Nos ensaios de cinética do crescimento em frascos T foram inoculadas dois frascos por dia de amostragem, dos quais foi retirado 1 mL de amostra para as determinações analíticas.

3.3.2.2 Propagação das células em garrafas rotatórias

As garrafas *roller bottles* foram acrescidas de 280 mL de meio de cultivo e mantidas a 37°C, sob rotação, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por aproximadamente 3 horas, para equilíbrio do pH e temperatura. O inóculo para cada experimento foi preparado através da propagação das células em sistema estático, conforme descrito no item 3.3.2.1 Após a inoculação, o volume de meio foi completado para 300 mL e as garrafas foram mantidas em estufa na rotação desejada.

3.3.2.3 Propagação das células em frascos agitados do tipo spinner

De forma semelhante ao item 3.3.2.2, as células empregadas como inóculo nos cultivos em frascos do tipo *spinner* foram propagadas em monocamada, empregando frascos de cultivo estáticos, conforme descrito no item 3.3.2.1, exceto quando foi necessária prévia adaptação do inóculo ao crescimento sob agitação.

Após autoclavação (121°C durante 20 minutos), os frascos *spinner* foram acrescidos de 80 mL de meio de cultivo e mantidos a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa por aproximadamente 3 horas, para equilíbrio do pH e temperatura. Após inoculação, o meio de cultura foi completado a 100 mL e os *spinners* levados à agitação em estufa.

3.3.3 Adaptação das células ao cultivo em sistemas agitados

Para adaptação dos hibridomas ao crescimento em sistemas agitados, foram testados diferentes protocolos citados na literatura.

3.3.3.1 Adaptação segundo Sinacore *et al.* (2000)

Neste método, as células foram cultivadas inicialmente em frascos T e em meio contendo SFB. Este cultivo foi utilizado para inocular frascos *spinner* em concentrações de 1 a 3 x 10⁵ céls/mL no mesmo meio de cultivo. A cada 2 ou 3 dias foi avaliada a viabilidade celular e ajustada novamente para 1 a 3 x 10⁵ céls/mL, através de diluição em meio fresco. Em algumas semanas, as células estavam totalmente adaptadas ao cultivo em sistemas agitados.

3.3.3.2 Adaptação segundo Scharfenberg e Wagner (1995)

Neste método, as células foram inicialmente adaptadas ao cultivo em meio livre de soro para posteriormente serem adaptadas ao cultivo em sistemas agitados. O autor usou a ausência de soro para que, sem os fatores de adesão, as células (no artigo, eram células CHO) se

mantivessem menos aderidas à superfície de cultivo. Deste modo, ainda no cultivo em frascos T, algumas células soltavam-se do frasco e ficavam em suspensão. Tais células eram transferidas para frascos *spinner*, onde foram realizadas várias passagens, entre as quais a velocidade de rotação foi aumentada lentamente de 20 a 50 rpm. Após algumas passagens, as células estavam adaptadas ao crescimento em sistemas agitados em meio livre de soro durante várias semanas e sem perda de produtividade.

3.3.3.3 Adaptação aumentando gradativamente a rotação do sistema *roller*

As garrafas *roller* inoculadas com células na concentração desejada (2×10^5 cél/mL) foram mantidas inicialmente em baixa rotação. O cultivo foi iniciado com a rotação de 4 rpm e, a cada 24 horas, a rotação foi aumentada, passando de 4 rpm para 8, 16, 32 e 40 rpm. Após esta adaptação, as células foram homogeneizadas no meio de cultivo, contadas e a suspensão celular obtida foi utilizada como inóculo de novas garrafas *roller* ou de frascos *spinner*.

3.3.4 Transferência das células para o meio livre de soro

Para transferência dos hibridomas ao meio de cultivo isento de soro EX-CELL[®] TiterHigh[™], seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante do meio, de transferência direta. Este método consiste em transferir as células cultivadas em meio de cultivo DMEM contendo 10% soro diretamente para uma garrafa estática contendo o meio Ex-Cell (totalmente sem SFB), sem nenhuma adaptação prévia.

Os experimentos analisados neste trabalho só foram realizados após os cultivos do hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue tipo 2 terem crescido durante três passagens no meio Ex-Cell.

3.3.5 Determinações analíticas

Diariamente, amostras de 1 mL dos cultivos foram retiradas para caracterização dos cultivos quanto ao crescimento celular, formação do produto e metabólitos produzidos.

3.3.5.1 Determinação da concentração e viabilidade celular

A concentração de células e viabilidade celular foram quantificadas através do método de exclusão do corante vital azul de trypan (Kuchler, 2000). Este método baseia-se no princípio de que o azul de trypan penetra apenas em células mortas, que têm a membrana celular comprometida, permitindo diferenciá-las claramente das viáveis, que ficam visíveis ao microscópio invertido com coloração clara e brilhante devido à sua refringência. Vinte microlitros de amostra do cultivo celular foram diluídos dez vezes na solução de azul de

trypan e colocados em câmara de Neubauer. Para cada avaliação, foram contados os oito quadrantes da câmara de Neubauer, os quais são sub-divididos em 16 partes. Caso a distribuição das células não estivesse homogênea, era feita nova preparação da câmara e nova contagem. A concentração celular, em número de células por mililitro, foi calculada através da divisão da contagem total encontrada pelo número de quadrantes (oito), multiplicando-se, em seguida, pelo fator de diluição (10) e pelo fator de correção da câmara, que é de 10^4 , uma vez que cada compartimento da câmara de Neubauer possui um volume de 10^{-4} mL. A viabilidade celular foi calculada como o percentual de células viáveis em relação ao total de células encontradas.

3.3.5.2 Determinação da concentração de nutrientes essenciais, metabólitos tóxicos e produto

Durante o cultivo dos hibridomas em sistema estático e em sistemas agitados, foram monitorados o consumo de dois nutrientes essenciais (glicose e glutamina) e a formação do produto e dos metabólitos lactato e amônio, os quais, dependendo da concentração no meio de cultivo, podem ser tóxicos às células. Alíquotas das amostras obtidas diariamente dos cultivos, após centrifugação a 190 xg para remoção de debris celulares, foram estocadas à temperatura de -20°C para posterior realização das determinações analíticas.

3.3.5.2.1 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente no meio de cultivo foi determinada através do uso do analisador bioquímico YSI-2700 Select (Yellow Springs Instruments, EUA), pertencente ao Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC-COPPE-UFRJ). O equipamento baseia-se na utilização de um biossensor contendo a enzima glicose oxidase. A reação enzimática gera peróxido de hidrogênio, que é detectado em um eletrodo de platina, sendo proporcional à concentração de glicose na amostra.

3.3.5.2.2 Determinação da concentração de glutamina

A concentração do aminoácido glutamina presente no meio de cultivo foi determinada através do uso do analisador bioquímico modelo YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments, EUA), pertencente ao Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC-COPPE-UFRJ). O equipamento baseia-se na utilização de um biossensor contendo as enzimas glutaminase e glutamato oxidase. A glutaminase transforma glutamina em glutamato e amônia e a glutamato oxidase transforma glutamato e oxigênio em peróxido de hidrogênio, α -

cetogluturato e amônia. O peróxido de hidrogênio é detectado em um eletrodo de platina, sendo proporcional à concentração de glutamina na amostra.

3.3.5.2.3 Determinação da concentração de amônio

A concentração de amônio presente no meio de cultivo foi determinada por teste enzimático através do *kit* da marca R-Biopharm/Roche (nº 11 112 732 035). A dosagem se baseia na reação dos íons amônio com 2-oxogluturato, na presença da enzima glutamato desidrogenase e da forma reduzida de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH), formando L-glutamato, NAD^+ e H_2O . A quantidade de NADH oxidado a NAD^+ , que é relacionada estequiometricamente à quantidade de amônio na amostra, é medida pela variação na absorbância lida a 340 nm.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 cavidades e a absorbância lida em leitor de ELISA (Bio-Rad).

Foi realizada uma curva padrão, a cada microplaca de ensaio, com o reagente padrão presente no *kit*. A equação da reta de cada microplaca foi aplicada na absorbância obtida em cada amostra (média de duplicatas) para o cálculo da concentração de amônio em cada amostra.

3.3.5.2.4 Determinação da concentração de lactato

A concentração de lactato presente no meio de cultivo foi determinada através do uso do analisador bioquímico modelo YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments, EUA), pertencente ao Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC-COPPE-UFRJ). O equipamento baseia-se na utilização de um biossensor contendo a enzima lactato oxidase. A reação enzimática gera peróxido de hidrogênio, que é detectado em um eletrodo de platina, sendo proporcional à concentração de lactato na amostra.

3.3.6 Determinação da concentração de anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2

Para quantificação do produto (anticorpo anti-dengue tipo 2) foi utilizado o *kit* de dosagem de IgG de camundongo da marca Pierce (Easy-Titer®IgG Mouse Assay Kit - nº 23300). Este *kit* tem sensibilidade para detecção de 15 a 300 ng/L de IgG e é realizado em microplacas de 96 orifícios. O ensaio consiste no uso de nanopartículas esféricas sensibilizadas com anticorpos anti-IgG de camundongo, as quais causam turbidez quando em suspensão no tampão de diluição, e absorvem a luz a 340 ou 405 nm. Estas partículas são incubadas com a amostra que contém o anticorpo monoclonal IgG, as quais se agregam às nanopartículas, causando um decréscimo na absorção da luz. Desta forma, baixas

concentrações de anticorpo na amostra levarão a altos valores de absorbância, enquanto altas concentrações do anticorpo levarão a valores baixos de absorbância.

3.3.7 Confirmação da produção do anticorpo anti-dengue tipo 2

A confirmação da produção do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 foi realizada pelo ensaio de neutralização PRNT (do inglês, *plaque reduction neutralization test*) (Russell *et al.*, 1967).

São preparadas placas de poliestireno para cultivo celular com seis orifícios, sendo adicionados em cada um 3 mL de uma suspensão de células Vero a $3,33 \times 10^5$ cél/mL. As placas são incubadas por 24 horas a 37° C, 5% de CO₂ e 90% de umidade para estabelecimento de uma monocamada celular aderente ao fundo de cada orifício. Posteriormente, o sobrenadante de cultivo do hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue tipo 2 é diluído em meio de cultivo de forma seriada, misturado à suspensão do vírus do dengue e incubado por uma hora. No próximo passo, as placas contendo a monocamada de célula Vero são retiradas da incubadora e o meio de cultivo é aspirado cuidadosamente. As misturas de vírus com o sobrenadante de cultivo em várias diluições são dispostas em duplicata nos orifícios das placas. Simultaneamente, a suspensão do controle de vírus do dengue tipo 2 é diluída em meio de cultivo e disposta nos seis orifícios de uma placa. Novamente as placas são incubadas nas mesmas condições, durante uma hora, para infecção das células pelos vírus que não foram neutralizados pelos anticorpos do sobrenadante de cultivo. O sobrenadante de cultivo é também aspirado cuidadosamente e é adicionado um meio de cultivo semi-sólido, CMC (carboximetilcelulose) a 3%. As placas são novamente incubadas, nas mesmas condições, durante uma semana. Após este período, é adicionado formol a 10% em cada orifício para fixação das células e inativação dos vírus, durante 30 minutos. As placas são, então, lavadas com água purificada e é adicionado cristal violeta a 0,04% em cada orifício para coloração das células, incubando-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. As placas são novamente lavadas com água potável e deixadas secando para posterior contagem do número de placas de lise por orifício da placa. Cada placa de lise corresponde a um grupo de células que foi lisada pelo que, inicialmente, era uma partícula viral que se replicou e infectou as células vizinhas. O título do ensaio de PRNT foi definido como a recíproca da diluição do soro que reduziu o número de placas de lise a 50%. O *end point* de 50% do teste foi determinado dividindo a média aritmética do número de placas de lise do controle de vírus por dois. A diluição do soro que alcançou a redução do número de placas de lise a 50% foi calculada através de regressão linear por interpolação das diluições correspondentes ao número de placas de lise imediatamente acima e abaixo do valor de *end*

point de 50% do teste. A diluição correspondente ao *end point* de cada sobrenadante será relativa ao nível de anticorpos presentes neste sobrenadante, pois neste caso não houve disponibilidade de um soro padrão para que fosse realizada uma curva padrão (Borges *et al.*, 2008).

3.3.8 Avaliação de grandezas representativas do metabolismo celular

Para a avaliação das condições de cultivo, foram calculados alguns parâmetros importantes relacionados ao metabolismo celular: concentração máxima de células ($X_{máx}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e coeficientes de rendimento de glicose em células ($Y_{X/glc}$), glutamina em células ($Y_{X/gln}$), células em produto ($Y_{P/X}$), glutamina em amônio ($Y_{NH4/gln}$), glicose em lactato ($Y_{lac/glc}$), glicose em produto ($Y_{P/glc}$) e glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) (Augusto *et al.*, 2008).

3.3.8.1 Determinação da taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp})

O cálculo da taxa específica de crescimento de uma população de células é realizado a partir dos dados de concentração celular ao longo do tempo, durante a fase exponencial de crescimento. Portanto, a taxa específica de crescimento durante a fase exponencial (μ_{exp}) foi calculada de acordo com a equação (1):

$$\mu_{exp} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

onde μ_{exp} refere-se à taxa específica de crescimento celular, X à concentração celular e t ao tempo de cultivo.

Desta forma, empregando essa expressão matemática, foi possível calcular μ , que reflete a cinética do crescimento celular e está relacionada ao tempo que as células levam, em média, para se duplicar ao longo da fase exponencial de crescimento.

O tempo de duplicação é determinado de acordo com a equação (2):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{exp}} \quad (2)$$

3.3.8.2 Determinação dos coeficientes de rendimento de nutrientes em células ($Y_{X/glc}$ e $Y_{X/gln}$)

A partir dos dados de concentração de cada nutriente (glicose e glutamina) e de concentração celular foi possível calcular os coeficientes de rendimento de nutrientes em células de acordo com as equações (3) e (4):

$$Y_{X/glc} = \frac{X_{f,exp} - X_0}{-(Glc_{f,exp} - Glc_0)} \quad (3)$$

$$Y_{X/gln} = \frac{X_{f,exp} - X_0}{-(Gln_{f,exp} - Gln_0)} \quad (4)$$

onde X refere-se à concentração celular, Glc à concentração de glicose e Gln à concentração de glutamina; f,exp indica a concentração ao final da fase exponencial e $_0$ indica a concentração no momento zero, após a inoculação.

Cabe ressaltar que os coeficientes de rendimento foram calculados para o intervalo de tempo decorrido entre a inoculação (0 h) e o término da fase exponencial de crescimento.

4.3.8.3 Determinação do coeficiente de rendimento de células em produto ($Y_{P/X}$)

A partir dos dados de concentração de produto (anticorpo anti-dengue 2) e de concentração celular foi possível calcular o coeficiente de rendimento de células em produto de acordo com a equação (5):

$$Y_{P/X} = \frac{P_{f,exp} - P_0}{X_{f,exp} - X_0} \quad (5)$$

onde X refere-se à concentração celular e P à concentração de IgG (produto); f,exp indica a concentração ao final da fase exponencial e $_0$ indica a concentração no momento zero, após a inoculação.

Cabe ressaltar que os coeficientes de rendimento foram calculados para o intervalo de tempo decorrido entre a inoculação (0 h) e o término da fase exponencial de crescimento.

3.3.8.4 Determinação dos coeficientes de rendimento de nutrientes em metabólitos

($Y_{lac/glc}$ e $Y_{NH4/gln}$)

A partir dos dados de concentração de cada nutriente (glicose e glutamina) e de concentração de cada metabólito (lactato e amônio) foi possível calcular os coeficientes de rendimento de nutrientes em produto de acordo com as equações (6) e (7):

$$Y_{lac/glc} = \frac{Lac_{f,exp} - Lac_0}{-(Glc_{f,exp} - Glc_0)} \quad (6)$$

$$Y_{NH_4/gln} = \frac{[NH_4]_{f,exp} - [NH_4]_0}{-(Gln_{f,exp} - Gln_0)} \quad (7)$$

onde $Lac_{f,exp}$, Lac_0 , $NH_{4 f,exp}$, $NH_{4 0}$, $Glc_{f,exp}$, Glc_0 , $Gln_{f,exp}$ e Gln_0 referem-se às concentrações de lactato, amônio, glicose e glutamina ao final da fase exponencial e no momento zero, após a inoculação, respectivamente.

Cabe ressaltar que os coeficientes de rendimento foram calculados para o intervalo de tempo decorrido entre a inoculação (0 h) e o término da fase exponencial de crescimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico, serão apresentados e analisados os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

4.1 Cultivo de hibridomas anti-dengue tipo 2 em sistema estático

O perfil de crescimento e especialmente, a produção de anticorpos *in vitro* do hibridoma anti-dengue 2, foram avaliados com o objetivo de dar início ao processo de otimização do cultivo *in vitro* das células do banco de hibridomas do Latam.

Como resultado dessa avaliação, espera-se poder reduzir significativamente os gastos na obtenção de anticorpos monoclonais, devido à consequente eliminação do uso de animais para produção de ascite, redução ou eliminação total da adição de soro animal aos meios de cultivo e, ainda, redução dos passos do processo de purificação do anticorpo.

Inicialmente, foi necessário analisar o perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue 2 em frascos T. A Figura 4.1 mostra o cultivo celular destes hibridomas sob microscópio ótico. É característico das células deste clone apresentarem-se pouco aderentes à superfície do frasco de cultivo, sendo possível vê-las na figura como várias partículas arredondadas. Na verdade, tais partículas são células viáveis que se mantiveram em suspensão.

Na Figura 4.2, é apresentado o perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 em frascos T, tendo sido usado o meio de cultivo empregado rotineiramente no Latam (DMEM suplementado com 10% de SFB). Observa-se que as células viáveis (representação através do símbolo ▲) alcançaram níveis superiores a 2 milhões de células por mililitro no terceiro dia de cultivo, com taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}) de 0,033/h e tempo de duplicação (t_d) 21,33 h (Tabela 4.1). Após a fase exponencial, houve queda da concentração de células viáveis e a viabilidade celular (representada pelo símbolo ■) também apresentou forte queda neste ponto, chegando a cerca de 50% no sétimo dia.

Perfis semelhantes de crescimento de hibridomas em frasco T foram obtidos por Mel e colaboradores (2008), que cultivaram o hibridoma RC1 em frascos T de 25 cm², em meio RPMI contendo 13,5% de SFB. Entretanto, estes autores obtiveram concentrações menores (5,8 x 10⁵ céls/mL em 94 horas) e viabilidade celular abaixo de 50% em 5 dias de cultivo. Tais diferenças podem estar relacionadas ao meio de cultivo ou à linhagem celular utilizados.

A Figura 4.2a apresenta o gráfico com o perfil de produção de IgG durante o cultivo citado acima. A concentração máxima de IgG foi de 0,4 µg/mL. Este resultado foi inferior ao obtido pelos autores citados no parágrafo anterior, que obtiveram concentrações 230 µg/mL de anticorpos. Esta diferença pode estar associada ao clone do hibridoma ou às diferenças

entre os meios de cultivo, assim como poderia ser algum artifício relacionado às diferentes técnicas de quantificação de IgG empregadas por Mel e colaboradores (2008) e no presente trabalho.

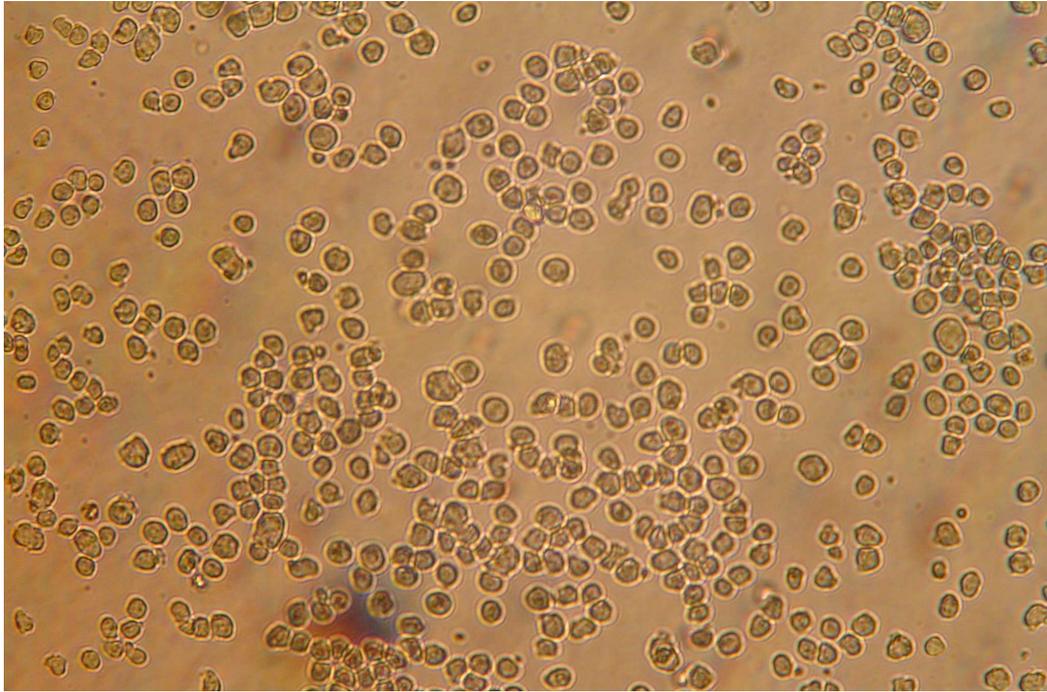


Figura 4.1: Foto do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2, sob microscópio óptico (aumento de 125x), após 4 dias de cultivo em frasco T, meio DMEM, adicionado de 10% de SFB.

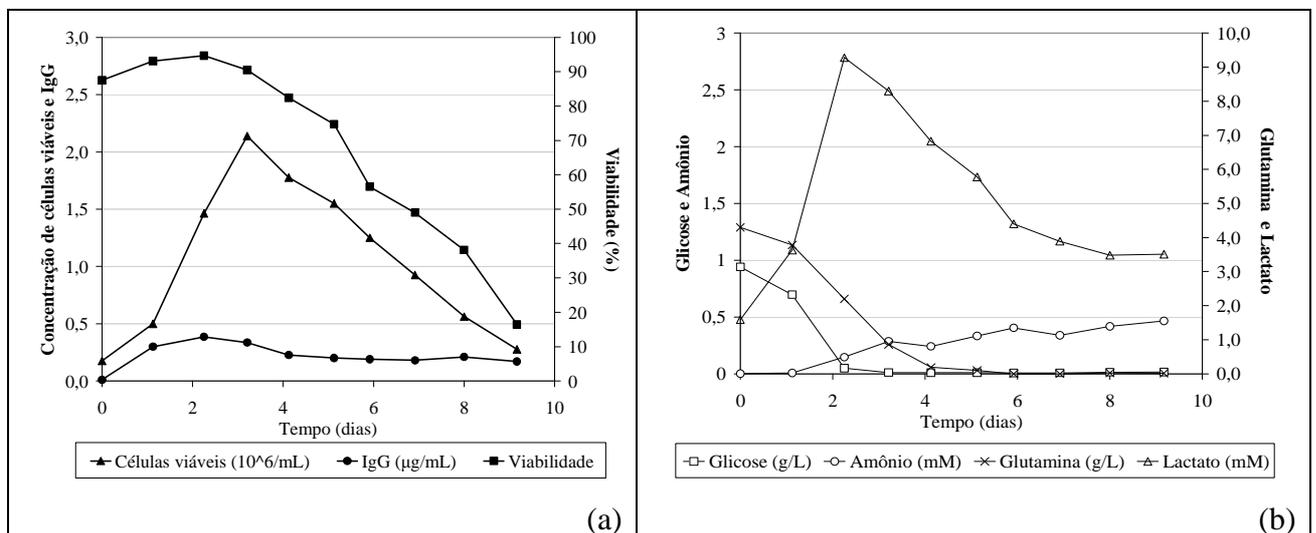


Figura 4.2: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos T (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Dando continuidade aos experimentos em frasco T, foi realizada a primeira tentativa de cultivar o hibridoma anti-dengue tipo 2 em meio sem SFB. Foi realizada a inoculação direta das células no frasco com 100% de meio Ex-Cell e os resultados estão apresentados na figura

4.3. Observa-se na Figura 4.3a que as células viáveis (\blacktriangle) alcançaram níveis superiores a 2 milhões de células por mililitro no quarto dia de cultivo, com μ_{exp} de 0,035 céls/h e t_d de 19,59 h e, posteriormente, iniciaram uma queda lenta, chegando ao décimo segundo dia de cultivo a menos de 1 milhão de células por mililitro, mas mantendo a viabilidade celular superior a 50% (\blacksquare). Quanto à produção de IgG, o cultivo em meio Ex-Cell resultou em uma concentração maior de anticorpos (1,75 $\mu\text{g/mL}$) do que em meio DMEM ($\approx 0,4 \mu\text{g/mL}$). Deste modo, pode-se afirmar que as células desenvolveram-se no meio Ex-Cell de modo semelhante ao meio DMEM com soro. Desta forma, mostrou-se desnecessária uma adaptação gradual dos hibridomas ao meio sem SFB.

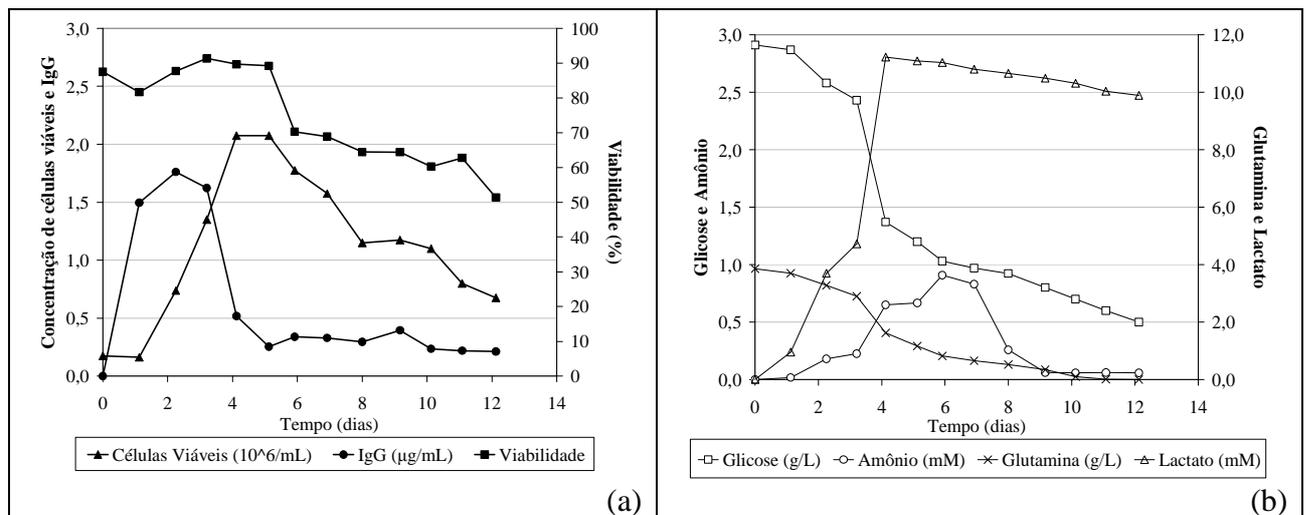


Figura 4.3: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos T (média das duplicatas dos cultivos) em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

O tempo de duplicação de células de mamíferos costuma variar entre 10 e 50 horas e, em sua maioria, as linhagens celulares possuem um tempo de duplicação por volta de 20-24 horas. O pico de concentração celular costuma ocorrer entre três e cinco dias (Mel *et al.*, 2008). Os resultados obtidos neste trabalho parecem seguir o padrão observado na maioria dos cultivos de células de mamíferos.

Observando-se o cultivo estático em frascos T, nota-se que o meio Ex-Cell forneceu melhores condições para o cultivo dos hibridomas, principalmente no que diz respeito à viabilidade celular, a qual foi mantida acima de 50% até o 12^o dia de cultivo. Este resultado não foi obtido no cultivo com meio DMEM, onde não foi possível manter a viabilidade acima de 50% já no oitavo dia de cultivo, mesmo com a adição de SFB. Isto demonstra a superioridade do meio Ex-Cell para cultivo do hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue em meio estático. Este resultado é muito importante, especialmente considerando que a eliminação do uso de soro animal na produção do anticorpo monoclonal pode ter impacto positivo na redução do custo de produção.

Lactato e amônio são os principais produtos resultantes do metabolismo da glicose e da glutamina, respectivamente, em células animais e sua presença no meio de cultivo pode diminuir o crescimento destas células e/ou afetar a produção da proteína de interesse (Reuveny *et al.*, 1987; Ozturk *et al.*, 1992). Confrontando-se os perfis de crescimento dos cultivos em frasco T às concentrações de nutrientes e metabólitos, confirma-se que a queda da concentração de células viáveis e da viabilidade celular parece estar associada principalmente à queda da concentração de nutrientes – glicose (\square) e glutamina (x) – e ao aumento da concentração de metabólitos – amônio (o) e lactato (Δ) (Figuras 4.2b e 4.3b e Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Resultados de concentração máxima de células ($X_{\text{máx}}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{X/\text{glc}}$, $Y_{X/\text{gln}}$, $Y_{P/X}$, $Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$, $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ – em frascos T utilizados com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell (Sigma).

	Frasco T DMEM	Frasco T Ex-Cell
$X_{\text{máx}}$ ($10^6/\text{mL}$)	2,1	2,1
μ_{exp} (1/h)	0,033	0,035
t_d (h)	21,33	19,59
$Y_{X/\text{glc}}$ (10^6cél/g)	2,1	1,3
$Y_{X/\text{gln}}$ (10^6cél/g)	0,6	0,9
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g}/10^6\text{cél}$)	0,2	0,5
$Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$ ($\mu\text{g/g}$)	0,083	0,304
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ ($\mu\text{g/g}$)	0,649	0,739

O amônio é um íon de alta relevância no metabolismo de células animais cultivadas *in vitro*, pois suas características físicas e químicas permitem sua difusão através da membrana celular e, dentro da célula, este íon irá competir com outros cátions pelo transporte ativo de proteínas carreadoras. Sua principal fonte no meio de cultivo é a glutamina, aminoácido de alta relevância para o metabolismo de células devido a sua entrada quase que direta no ciclo do ácido cítrico, sendo, portanto, rápida fonte de energia para a célula. O excesso de amônio no ambiente de cultivo pode levar à inibição do crescimento celular e da formação de produto. Concentrações entre 2 e 10 mM de amônio podem reduzir consideravelmente o crescimento celular, dependendo da linhagem celular. Além disto, pode induzir morte celular por apoptose ou necrose, porém, geralmente, sem afetar a produtividade de hibridomas (Schneider *et al.*, 1996).

Considerando que a glutamina é uma importante fonte de energia para a célula, estimulando o crescimento e a produção de anticorpo, e é altamente lábil, inclusive sofrendo degradação térmica com geração de amônio antes mesmo de participar do metabolismo celular, é de extrema importância que este nutriente seja precisamente dosado no meio de cultivo para que não haja limitação deste, nem excesso do metabólito tóxico dele proveniente. A substituição de glutamina por glutamato ou outro aminoácido, no meio de cultivo, pode ser um modo de reduzir a formação de amônio decorrente do consumo e decomposição de glutamina. Alternativamente, o amônio, devido a sua característica volátil, pode ser removido do meio de cultivo através do uso de membranas porosas hidrofóbicas, aplicação de membranas de troca iônica, uso de resinas de troca iônica ou eletrodialise (Schneider *et al.*, 1996).

Em cultivos de hibridoma em frascos T contendo meio DMEM com 10% de soro de cavalo, McQueen e Bailey (1990) observaram que 3 mM de cloreto de amônio adicionado ao meio causaram pouco efeito ao crescimento celular, apesar de aumentar a duração da fase lag, especialmente se o pH extracelular estivesse a 6,8. Já em 10 mM de cloreto de amônio, houve inibição significativa do crescimento celular. Tal observação levou estes autores a deduzirem que a inibição causada pelo cloreto de amônio não está relacionada à alteração de pH. Apesar das considerações acima, é importante ressaltar que o efeito inibitório do amônio difere significativamente entre linhagens celulares (Miller *et al.*, 1988a). Nos experimentos em frasco T realizados com o hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue 2, em meio com SFB e livre de soro, as concentrações de amônio não alcançaram os valores inibitórios relatados na literatura, mas parecem ter afetado o crescimento e a viabilidade celular. Tais observações indicam que este hibridoma parece ser mais sensível às concentrações de amônio nas condições de cultivo adotadas neste trabalho.

O lactato é produto da oxidação parcial da glicose utilizada pela célula pela via glicolítica. O piruvato, produto final desta via, é convertido a lactato para equilibrar o estado de oxidação do cofator NAD (do inglês, *nicotinamide adenine nucleotide*), molécula essencial para o fluxo de energia intracelular. A ação tóxica do lactato é principalmente devido ao seu efeito de baixar o pH e afetar a osmolalidade do meio de cultivo quando em altas concentrações (> 20-30 mM), tornando inviáveis várias reações do metabolismo celular (Schneider *et al.*, 1996; Genzel *et al.*, 2006). Deste modo, sistemas sem controle de pH são mais suscetíveis às variações de lactato do que aqueles em que este parâmetro é controlado (Miller *et al.*, 1988b). Reuveny e colaboradores (1987) observaram que, adicionando-se lactato ao cultivo do hibridoma VII H-8, só foi observada inibição do crescimento acima de 28 mM deste metabólito. A adaptação de cultivos de hibridomas à alta osmolalidade do meio foi

demonstrada como um modo de aumentar a longevidade da cultura e a produção de anticorpos devido ao prolongamento da fase de crescimento celular (Oh *et al.*, 1993). Cultivando hibridomas CRL-1606 em frascos T com DMEM suplementado com 5% de SFB, Ozturk e colaboradores (1992) observaram que não ocorre alteração significativa no crescimento destes hibridomas em concentrações de até 40 mM de lactato e, a ação direta deste metabólito só se inicia em concentrações entre 40 e 50 mM. Os autores citados acima só observaram inibição direta ou indireta do lactato – através do pH e da osmolalidade – em níveis muito superiores aos encontrados nos cultivos em frascos T dos hibridomas secretores dos anticorpos monoclonais anti-dengue 2. Isto indica que o hibridoma cultivado neste trabalho parece ser também mais sensível às concentrações de lactato, nas condições de cultivo experimentadas.

Em presença de altas concentrações de glicose e glutamina, a glicose é rapidamente metabolizada através da glicólise e a glutamina é oxidada através de vários processos metabólicos, gerando rapidamente altas concentrações dos metabólitos tóxicos lactato e amônio. Portanto, é essencial que o fornecimento inicial de glicose e glutamina seja cuidadosamente avaliado em cultivos em batelada ou sua retirada e adição de meio fresco seja adequadamente equilibrada em cultivos contínuos (Schneider *et al.*, 1996). Glicose e glutamina fornecidas em pulsos em cultivos de hibridomas (Miller *et al.*, 1988a e b) mostraram que o consumo de glicose aumenta de 100 a 200% logo depois de sua adição, enquanto o consumo de glutamina é mais lento e ocorre um aumento nas dosagens de ATP (adenosina trifosfato) logo após o consumo de glutamina. Isto se deve, provavelmente, à entrada da glutamina no metabolismo celular se dar diretamente através do ciclo do ácido cítrico, ciclo metabólico mais complexo e mais produtivo em termos de energia (ATP). Schneider e Lavoix (1990), cultivando hibridomas em meio BDM (IDE + Ham's F12 + NCTC 135) sem adição de soro animal, observaram que a concentração de glutamina é claramente o fator limitante para o cultivo destes hibridomas. Somente quando este aminoácido foi adicionado ao meio na concentração de 8 mM, houve alto crescimento celular e alta produção de anticorpos. Nestes experimentos, a glicose não pareceu ser um fator limitante, mas sua concentração inicial era de 25 mM, portanto bastante superior às utilizadas nos meios de cultivo do presente trabalho. No artigo de Shneider e Lavoix (1990) as concentrações de amônio (5-6,3 mM) e lactato (24-36 mM) geradas a partir da glutamina e da glicose, respectivamente, não foram altas. O lactato foi apenas limitante no modo de cultivo em perfusão com reciclo celular. A amônia permaneceu estável no meio de cultivo, sem aparentemente causar limitações ao crescimento celular e à produção de anticorpos. Genzel e colaboradores (2006) realizaram experimentos em garrafas *roller*, utilizando células MDCK

tanto em meios contendo SFB, como livres de soro, e observaram que, em baixas concentrações de glicose, tanto em meios livres de glutamina – substituída por piruvato – quanto em meios contendo este aminoácido, ocorre baixo consumo de glicose e baixa produção de lactato. No que se refere ao metabolismo da glutamina, foi observado que, independente da quantidade presente no meio, todo este aminoácido é consumido ao longo do cultivo e o aumento da produção de amônio não parece estar relacionado somente com o consumo de glutamina, mas também com o de outros aminoácidos presentes no meio. Mercille e Massie (1994), durante o cultivo de hibridomas em batelada simples, observaram que ocorre indução de apoptose celular quando há falta de glicose ou glutamina no meio, enquanto o excesso de lactato e amônia levam à morte por necrose.

Os experimentos realizados neste trabalho, com o hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue tipo 2, mostraram concordância com a literatura nos aspectos em que a glutamina – concentração inicial de 4,3 g/L no DMEM e 3,85 g/L no Ex-Cell – e a glicose, quando em concentração inicial de 1 g/L (DMEM), são totalmente consumidas durante os cultivos. Quando a concentração inicial de glicose é de aproximadamente 3 g/L (Ex-Cell), esta chega ao final do cultivo sem ser totalmente consumida, mostrando que ambos nutrientes são fundamentais ao metabolismo do hibridoma, mas que a glutamina parece ser preferencialmente consumida pelas células.

As Figuras 4.2a e 4.3a e a Tabela 4.2 mostram que a produção de anticorpos (●) pelos hibridomas cultivados no meio Ex-Cell foi bem mais expressiva do que no meio DMEM, alcançando 1,5 µg/mL no primeiro dia de cultivo com o primeiro meio. Em meio DMEM foi obtido somente 0,38 µg/mL no segundo dia de cultivo. Com o meio Ex-Cell, as concentrações de anticorpo ainda se mantiveram no mesmo nível até o terceiro dia de cultivo, caindo posteriormente, indicando que, para a produção do mesmo para os *kits* de diagnóstico, o cultivo deverá ser curto, sendo interrompido no momento em que a produtividade volumétrica for máxima.

A observação da queda da concentração de produto (IgG), após a fase exponencial de crescimento celular, não pode ser explicada através de nenhum mecanismo de degradação de anticorpo conhecido pela literatura.

Tabela 4.2: Resultados de concentração máxima de produto ($P_{m\acute{a}x}$), produtividade volumétrica máxima ($P_{v,m\acute{a}x}$) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{P/glc}$, $Y_{P/gln}$, $Y_{P/X}$ – em frascos T utilizados com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell.

	Frasco T DMEM	Frasco T Ex-Cell
$P_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/mL}$)	0,4	1,8
$P_{v,Max}$ ($\mu\text{g/mL/d}$)	0,3 (27 h)	1,3 (27 h)
$Y_{P/glc}$ ($\mu\text{g/g}$)	0,351	0,652
$Y_{P/gln}$ ($\mu\text{g/g}$)	0,095	0,470
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g}/10^6\text{c\acute{e}l}$)	0,2	0,5

Mel e colaboradores (2008) observaram que é durante o período de crescimento celular que ocorre a maior produção de anticorpo. Somente em alguns casos, a formação de produto pode continuar ocorrendo durante as fases estacionária e de morte celular. No presente trabalho os resultados obtidos indicam que a maior produção de anticorpo anti-dengue 2 em frascos T, mesmo baixa, foi mais significativa no período de crescimento celular (fase exponencial), o qual é influenciado direta ou indiretamente pelas concentrações de glicose, glutamina, lactato e amônio, o que parece seguir o padrão observado na maioria dos cultivos de células de mamíferos descrito na literatura.

4.2 Cultivo de hibridomas anti-dengue tipo 2 em sistemas agitados

4.2.1 Adaptação a sistemas agitados

Como o objetivo principal deste trabalho foi obter o anticorpo monoclonal anti-dengue 2 através do cultivo do hibridoma secretor em sistemas agitados, após a verificação do perfil de crescimento e de produção deste hibridoma em frascos T, as células foram inoculadas em frascos *spinner*, a 50 rpm, diretamente de frascos T, para observar o perfil de crescimento neste sistema.

A Figura 4.4 mostra os resultados obtidos do cultivo dos hibridomas em frascos *spinner* a 50 rpm, inoculados com células retiradas de cultivos em frascos T, em meio DMEM com 10% de SFB. Na Figura 4.4a, observa-se que as células viáveis (\blacktriangle) alcançaram níveis pouco superiores a 1,5 milhões de células por mililitro no terceiro dia de cultivo, com μ_{exp} igual a

$0,0409 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 16,96 h, na fase exponencial, mas a concentração de células viáveis decaiu rapidamente e a viabilidade celular (■) chegou a 30% em apenas cinco dias de cultivo.

St. Groth (1983) estudou 10 hibridomas cultivados *in vitro* e observou que todos necessitaram de agitação mais baixa que 60 rpm. Como é fato que vários aspectos do crescimento celular variam de acordo com a linhagem, é possível que 50 rpm seja ainda uma rotação muito alta para o hibridoma anti-dengue tipo 2, sem que o mesmo tenha sofrido um processo de adaptação à agitação.

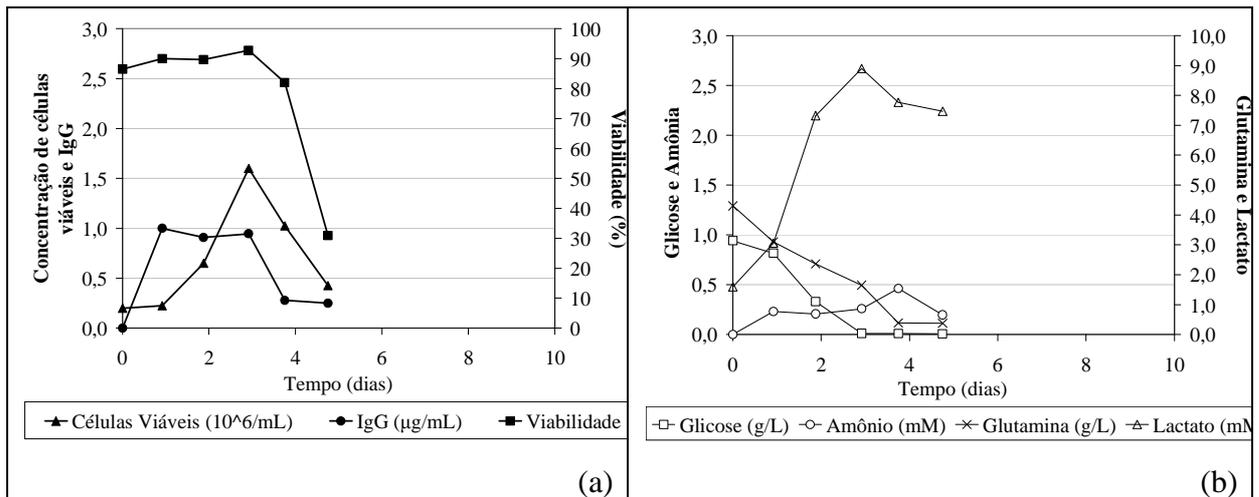


Figura 4.4: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células cultivadas em frascos T, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Como a passagem direta dos hibridomas do cultivo em frascos T para o inóculo em frascos *spinner* gerou perda da viabilidade do cultivo em poucos dias, foi necessário estabelecer um método de adaptação dos hibridomas ao cultivo em sistema agitado. Os métodos sugeridos por Scharfenberg e Wagner (1995) e Sinacore *et al.* (2000) foram testados, mas em ambos os protocolos não foram obtidos resultados satisfatórios. Não foi possível reproduzir o método desenvolvido por Sinacore *et al.* (2000), pois a cada tentativa de manter as células em *spinner*, a curva de crescimento observada era equivalente à da Figura 4.4. O método de Scharfenberg e Wagner (1995) foi testado, mas o agitador magnético disponível não permitia rotações menores que 50 rpm, o que impediu uma adequada adaptação, de modo que, novamente, o perfil do cultivo celular resultante foi semelhante ao da Figura 4.4.

Devido aos insucessos citados acima, foram utilizadas garrafas *roller* com o sistema de agitação *Universal turner device* (Greiner) para uma nova tentativa de adaptação dos hibridomas ao cultivo em sistemas agitados. Este sistema de agitação pode ser utilizado em rotações a partir de 0,5 rpm, portanto bem mais baixas que a mínima do agitador magnético.

Garrafas *roller* foram utilizadas por Genzel e colaboradores (2006) para adaptar as células ao cultivo em sistema agitado e em meio livre de soro para serem, posteriormente, inoculadas em biorreatores de tanque agitado. Hundt e colaboradores (2007) utilizaram garrafas *roller* para adaptação de fibroblastos de pulmão de embrião de gato (E-FL) ao cultivo em suspensão em biorreatores *wave* e biorreatores do tipo tanque agitado e obtiveram bom resultados de cultivo celular e produtividade do vírus da enterite em minks (MEV). Berson e Friederichs (2008) utilizaram garrafas *roller* para o cultivo de células em suspensão e as consideraram um bom sistema para cultivo de células de mamíferos sensíveis a tensões de cisalhamento, pois fornecem agitação suave, mas promovem boa transferência de nutrientes e oxigênio.

No presente trabalho, garrafas *roller* foram inoculadas com o hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue tipo 2 e agitadas inicialmente a 4 rpm para observação do perfil de crescimento do hibridoma, como mostra a Figura 4.5. Na Figura 4.5a observa-se que as células viáveis (\blacktriangle) alcançaram concentrações abaixo de 1,5 milhões de células/mL, com valor de μ_{exp} de $0,0398 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 17,43 h, e também perderam a viabilidade (\blacksquare) em 7 dias de cultivo. Portanto, neste primeiro cultivo em garrafas *roller*, conduzido a 4 rpm, os resultados não foram muito diferentes dos obtidos no cultivo direto em *spinner* (Figura 4.4).

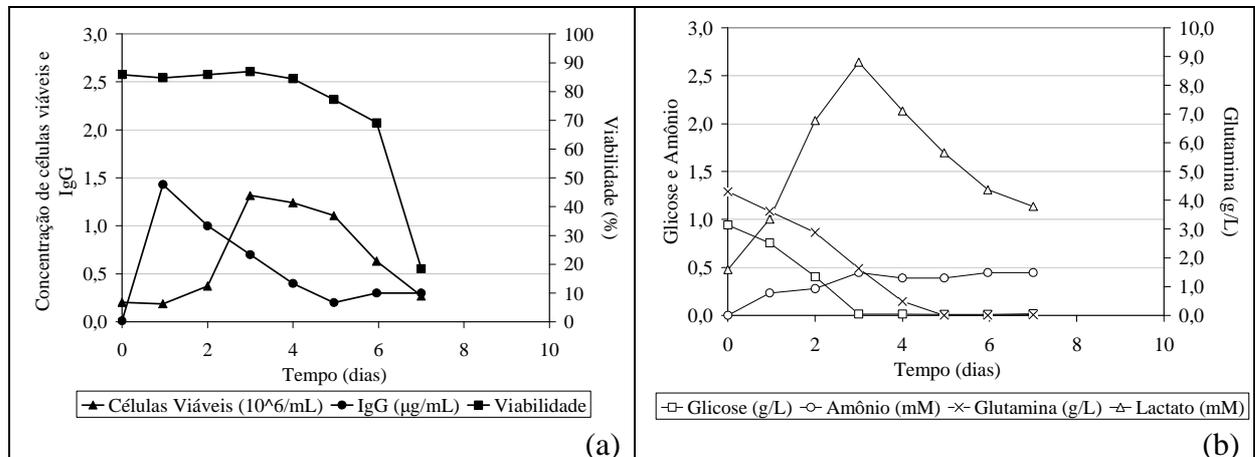


Figura 4.5: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas *roller* a 4 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Como o objetivo era adotar rotações maiores em *spinner*, foi testado um método de adaptação a maiores rotações utilizando garrafas *roller*. Desta forma, foi realizado mais um ensaio em *roller*, onde as células foram mantidas por 24 horas a 4 rpm, 24 horas a 8 rpm, 24 horas a 16 rpm e, posteriormente, foram centrifugadas, contadas e inoculadas em duas outras garrafas *roller* a 16 rpm, onde, mais uma vez, foi acompanhado o perfil de crescimento do hibridoma. A Figura 4.6 mostra que as células viáveis (\blacktriangle) alcançaram níveis superiores a

2 milhões de células por mililitro no quarto e quinto dias, com μ_{exp} de $0,0294 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 23,51 h, observando-se posteriormente, uma queda brusca de concentração de células viáveis. Neste cultivo, a viabilidade celular (■) alcançou valores abaixo de 50% somente no sétimo dia após o inóculo, 3 e 4 dias após a exaustão de glutamina e de glicose no meio de cultivo, respectivamente.

Como a concentração máxima de células viáveis foi similar àquela obtida em frascos T, foi avaliado o crescimento destas células adaptadas em garrafas *roller*, em meio Ex-Cell. A Figura 4.7 mostra que as células viáveis (▲) alcançaram níveis superiores a 2 milhões de células por mililitro já no terceiro dia e se mantiveram assim até o sétimo dia, com μ_{exp} de $0,0331 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 20,91 h. Posteriormente, ocorreu queda de viabilidade (■), que somente alcançou valores abaixo de 50% no oitavo dia após o inóculo, juntamente com a queda na concentração de glicose, como observado no cultivo em meio DMEM.

Quanto às concentrações de anticorpo, observa-se na Figura 4.5a, que estas foram significativamente superiores às obtidas em frascos T, quando foi utilizado o meio DMEM (Figura 4.3a). Já quando utilizado o meio Ex-Cell, estes valores foram um pouco superiores no cultivo em frascos T (Figuras 4.2a e 4.4a).

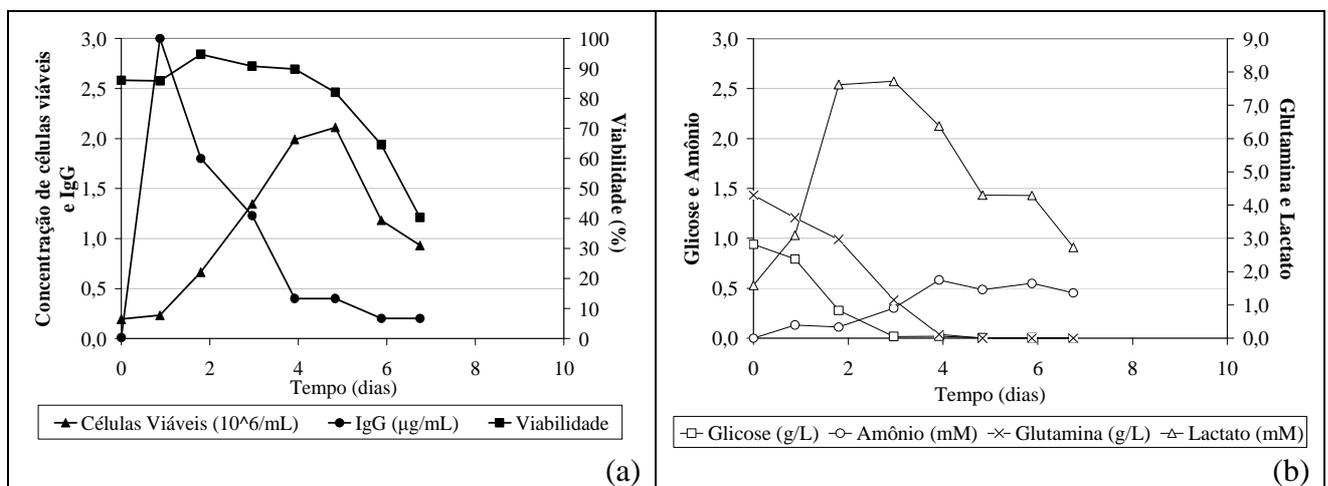


Figura 4.6: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas *roller* a 16 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

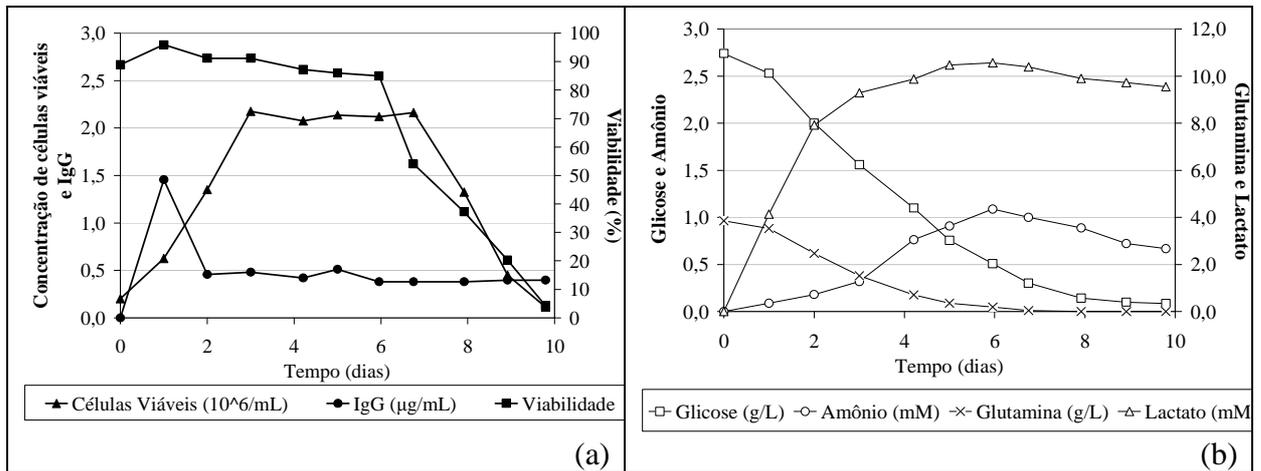


Figura 4.7: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas *roller* a 16 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Os resultados obtidos são compatíveis com Berson e Friederichs (2008), que, ao cultivar hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-acetilcolinesterase de eritrócitos humanos em garrafas *roller* auto-alimentadas, utilizando 0,2% de SFB, em meio PFHM-II (Gibco) livre de proteínas, em rotações de 0,25 e 0,5 rpm, encontraram bons resultados de concentração celular – entre 1,2 e 1,8 milhões de células por mililitro – e de concentração de anticorpos, chegando a $69 \mu\text{g}/10^6$ céls/dia.

Na tabela 4.3, estão dispostos os resultados de taxa específica de crescimento celular na fase exponencial, tempo de duplicação e coeficientes de rendimento - $Y_{X/\text{glc}}$, $Y_{X/\text{gln}}$, $Y_{P/X}$, $Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$, $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$, $Y_{P/\text{glc}}$, $Y_{P/\text{gln}}$, $Y_{P/X}$ – referentes aos experimentos citados acima.

Tabela 4.3: Resultados de concentração máxima de células ($X_{\text{máx}}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d), quantidade máxima de produto ($P_{\text{máx}}$), produtividade volumétrica máxima ($P_{V,\text{Máx}}$) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{X/\text{glc}}$, $Y_{X/\text{gln}}$, $Y_{P/X}$, $Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$, $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$, $Y_{P/\text{glc}}$, $Y_{P/\text{gln}}$, $Y_{P/X}$ – em frascos *spinner* (sem adaptação) e garrafas *roller* com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell (Sigma).

	<i>Spinner</i> DMEM (frasco T)	<i>Roller</i> DMEM 4 rpm	<i>Roller</i> DMEM 16 rpm	<i>Roller</i> Ex-Cell 16 rpm
$X_{\text{máx}}$ ($10^6/\text{mL}$)	1,6	1,3	2,1	2,2
$P_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1,0	1,4	2,8	1,5
$P_{V,\text{Máx}}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{d}$)	1,1 (22 h)	1,5 (23 h)	3,2 (21 h)	0,8 (24 h)
μ_{exp} (1/h)	0,041	0,040	0,029	0,033
t_d (h)	16,96	17,43	23,51	20,91
$Y_{X/\text{glc}}$ ($10^6\text{cél}/\text{g}$)	1,7	1,5	2,3	1,7
$Y_{X/\text{gln}}$ ($10^6\text{cél}/\text{g}$)	1,0	0,6	0,5	0,8
$Y_{P/\text{glc}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,068	0,984	3,086	0,399
$Y_{P/\text{gln}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,038	0,367	0,881	0,202
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g}/10^6\text{cél}$)	0,6	0,7	1,9	0,2
$Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,019	0,106	0,128	0,137
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,726	0,663	0,381	0,708

4.2.2 Cultivo em frascos *spinner* com células adaptadas em *roller*

Após o cultivo em garrafas *roller* ter apresentado um perfil aceitável de crescimento e boa viabilidade celular, decidiu-se utilizar o mesmo tipo de adaptação para nova tentativa de acompanhamento do perfil de crescimento do hibridoma em frascos *spinner*. Após a adaptação até 16 rpm, os sobrenadantes de cultivo em *roller* foram centrifugados e as células inoculadas em frascos *spinner* a 50 rpm, em meio DMEM com 10% de SFB. Como mostrado na Figura 4.8, observa-se que as células viáveis (\blacktriangle) alcançaram níveis um pouco superiores a 1,5 milhões de células por mililitro no terceiro dia de cultivo, obtendo-se μ_{exp} de $0,0376\text{ h}^{-1}$ e t_d de 18,41 h, mas a concentração de células viáveis decaiu rapidamente. A viabilidade celular (\blacksquare) chegou a 30% em apenas seis dias de cultivo.

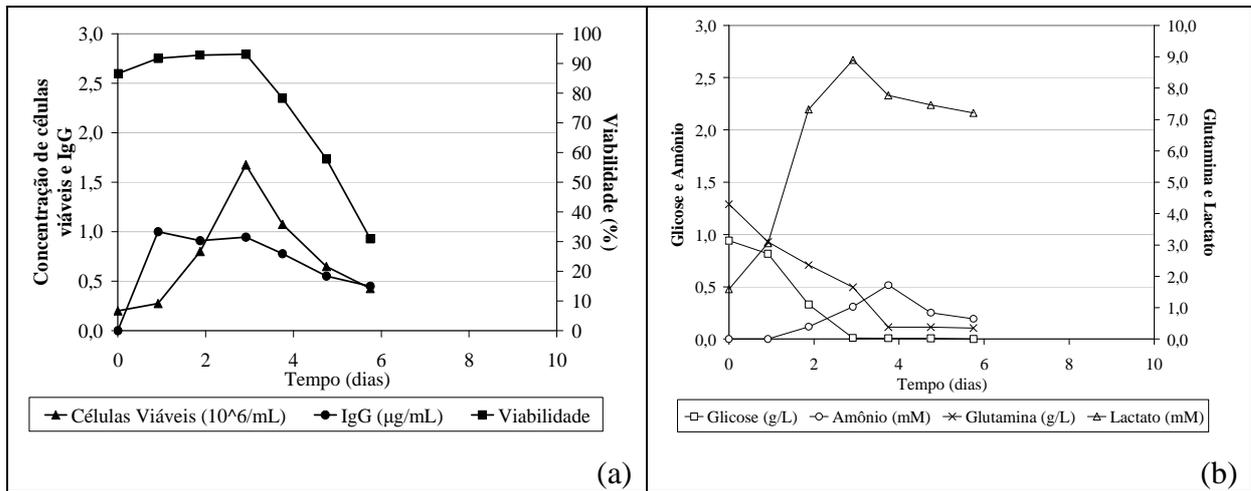


Figura 4.8: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 16 rpm, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Apesar da adição de 10% de SFB, considerado como protetor contra o cisalhamento das células (Doyle e Griffiths, 1998) no meio DMEM, a adaptação até 16 rpm não parece ter sido eficiente, pois a Figura 4.8 mostra um perfil de crescimento celular com rápida queda de viabilidade. Este resultado parece indicar a necessidade de um período maior de adaptação das células ao sistema agitado.

Assim, uma tentativa de adaptação das células foi realizada, adaptando as células em garrafas *roller* até 40 rpm. Foi realizado um experimento onde as células, após a adaptação seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, foram inoculadas ainda em garrafas *roller* com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e simultaneamente em meio Ex-Cell, para observação do perfil de crescimento. Como mostrado na Figura 4.9a, observa-se que, quando utilizado o meio DMEM, as células viáveis pouco ultrapassaram 1 milhão de células por mililitro no quarto dia de cultivo, com μ_{exp} de $0,0245 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 28,27 h. Após 24 horas, inicia-se a queda de viabilidade que continua até o final do cultivo, nove dias após a inoculação.

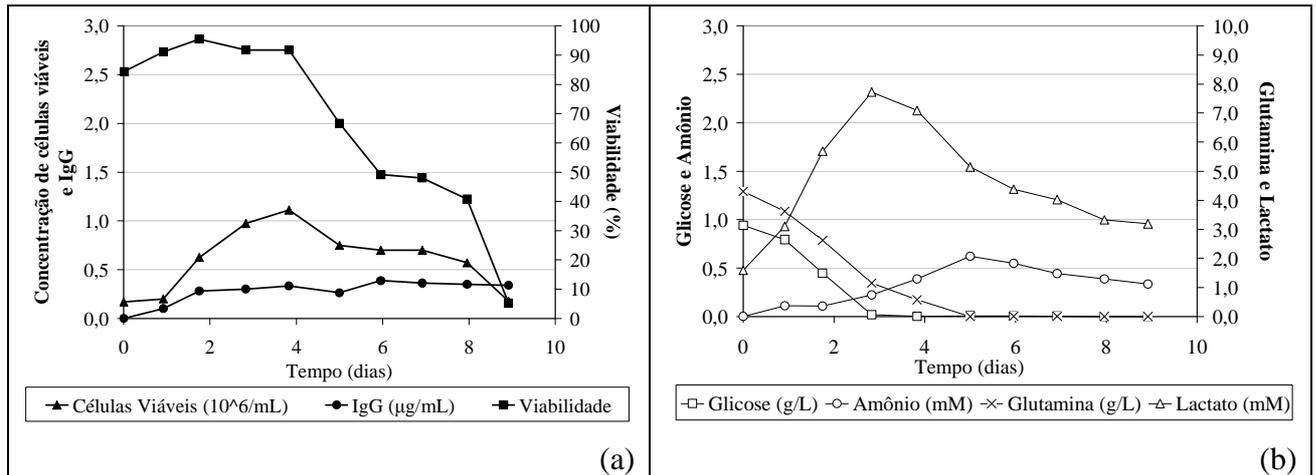


Figura 4.9: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas *roller* a 40 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

A Figura 4.10 mostra o perfil de cultivo dos hibridomas em meio Ex-Cell, onde se observa que as células viáveis alcançaram níveis superiores a 3,5 milhões de células por mililitro no quarto dia de cultivo, com μ_{exp} de $0,0315 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 22,03 h, decaindo abaixo de 2 milhões/mL somente no sétimo dia de cultivo, juntamente com a queda de viabilidade celular.

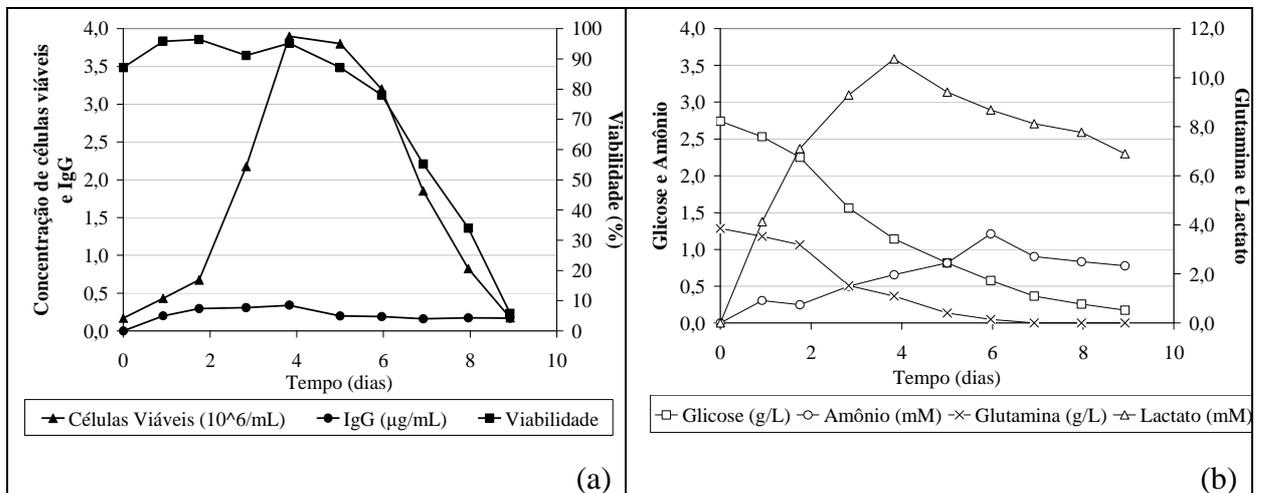


Figura 4.10: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em garrafas *roller* a 40 rpm (média das duplicatas dos cultivos) em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma), incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Os bons perfis resultantes do crescimento celular em *roller* e, especialmente em meio Ex-cell, motivaram a realização dos experimentos em *spinner*, utilizando como inóculo, células adaptadas em *roller* até 32 e 40 rpm (máximo alcançado pelo sistema *Universal turner device*), utilizando simultaneamente os dois meios de cultivo avaliados neste trabalho. Na Figura 4.11a, observa-se que, para células previamente adaptadas em *roller* a 32 rpm em meio

DMEM com 10% de SFB, as células viáveis alcançaram níveis superiores a 2 milhões de células por mililitro no terceiro dia de cultivo, com μ_{exp} de $0,0283 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 24,46 h, mantendo-se neste nível por 24 horas e decaindo posteriormente até o final do cultivo, em nove dias, juntamente com a viabilidade celular, que chegou a ser menor que 30% no sétimo dia de cultivo.

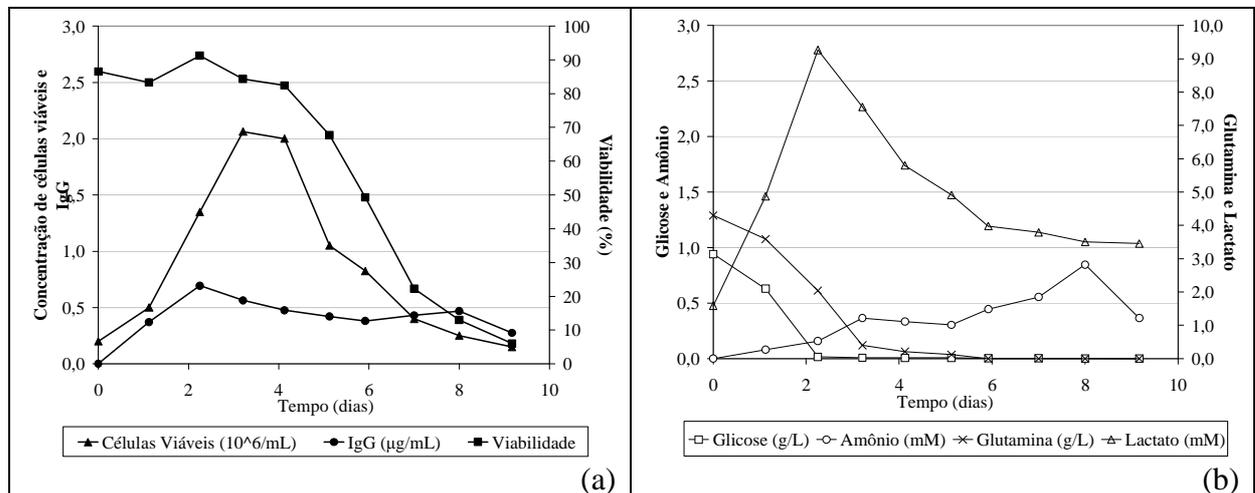


Figura 4.11: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 32 rpm, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

A Figura 4.12 mostra o perfil de crescimento do hibridoma cultivado em meio Ex-Cell em frascos *spinner* a 50 rpm, inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 32 rpm. A figura 4.12a mostra que, em meio Ex-Cell, as células viáveis alcançaram 2 milhões de células por mililitro no quinto dia de cultivo, com μ_{exp} de $0,0202 \text{ h}^{-1}$ e t_d de 34,3 h, e decaíram posteriormente até o final do cultivo, 10 dias após a inoculação. A viabilidade celular sofreu decréscimo também após o quinto dia de cultivo, mas ainda no último dia se mantinha pouco acima de 50%. Esta característica difere significativamente do cultivo no mesmo sistema em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, o que parece indicar que o meio Ex-Cell possui algum(ns) componente(s) que aumenta(m) a viabilidade celular, seja por proteção do cisalhamento celular, inibição da apoptose ou algum outro mecanismo.

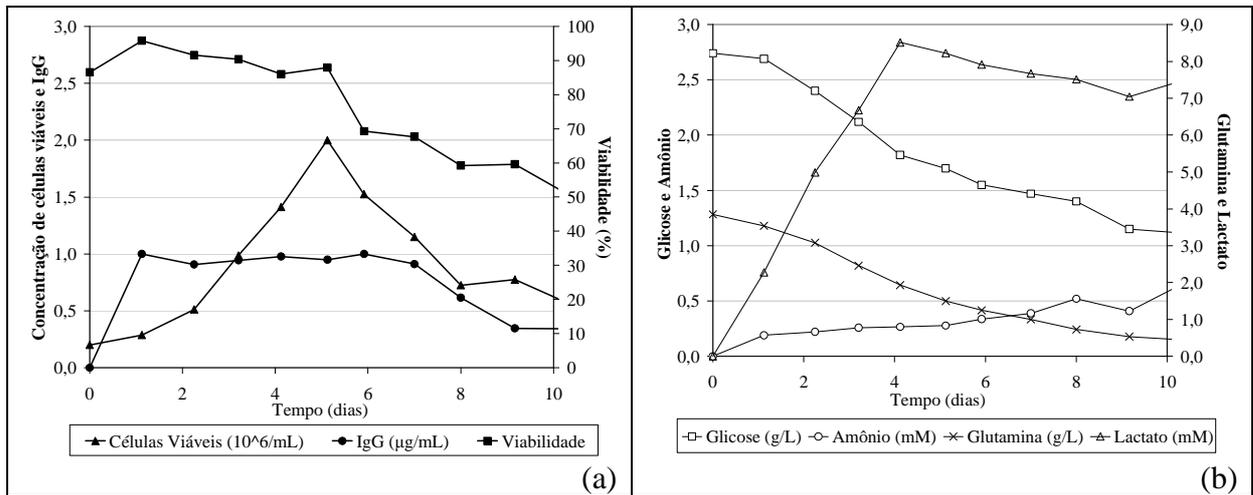


Figura 4.12: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 32 rpm, em meio Ex-Cell para hibridomas, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Como etapa seguinte, foi avaliado como inóculo o uso de células adaptadas ao cultivo em *roller* a 40 rpm. A Figura 4.13, mostra, portanto, o perfil de crescimento do hibridoma cultivado em meio DMEM suplementado com 10% de SFB em frascos *spinner* a 50 rpm. As células viáveis alcançaram 1,5 milhões de células por mililitro no terceiro dia de cultivo, com μ_{exp} igual a 0,0313 h⁻¹ e t_d igual a 22,15 h. Vinte e quatro horas depois, houve queda da concentração de células viáveis, juntamente com a viabilidade celular, que chegou a 50% no sexto dia de cultivo.

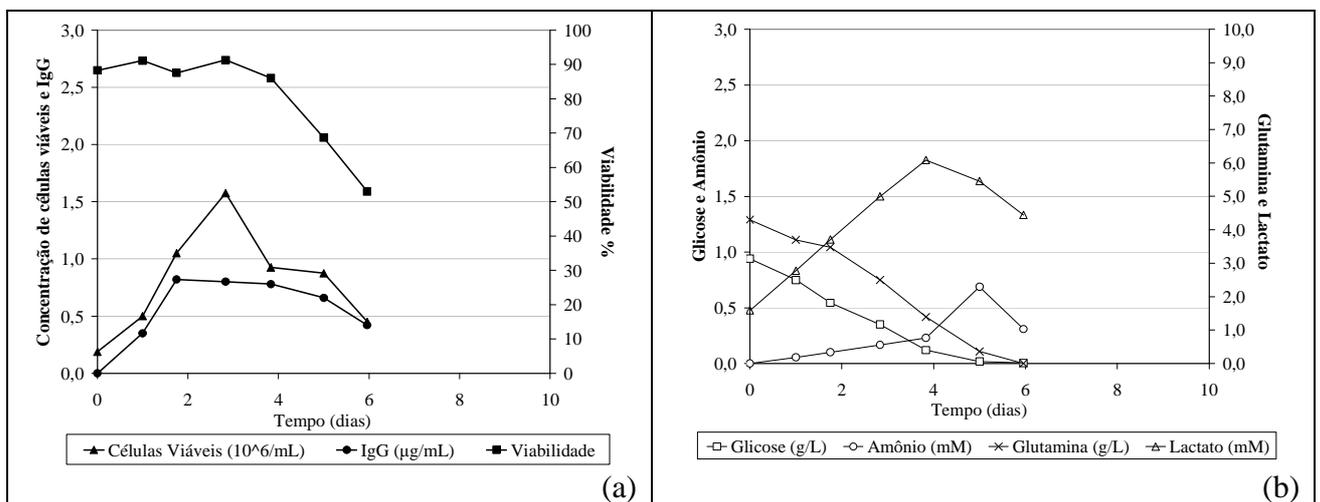


Figura 4.13: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm, em meio DMEM com 10% de SFB, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Em meio Ex-Cell, o perfil de crescimento de cultivo do hibridoma foi semelhante ao em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Observa-se, na Figura 4.14a, que as células viáveis alcançaram níveis cerca de 1,5 milhões de células por mililitro com quatro dias de cultivo, com μ_{exp} igual a $0,0212 \text{ h}^{-1}$ e t_d igual a 32,77 h. No sexto dia de cultivo, houve queda da concentração de células viáveis, juntamente com a viabilidade celular, que chegou a menos de 40 % no final dos 8 dias de cultivo. A principal diferença entre estes sistemas foi que, mais uma vez, o meio Ex-Cell forneceu condições para que as células se mantivessem por mais tempo. Além disto, a produção de anticorpo foi expressivamente maior no meio Ex-Cell que em meio DMEM.

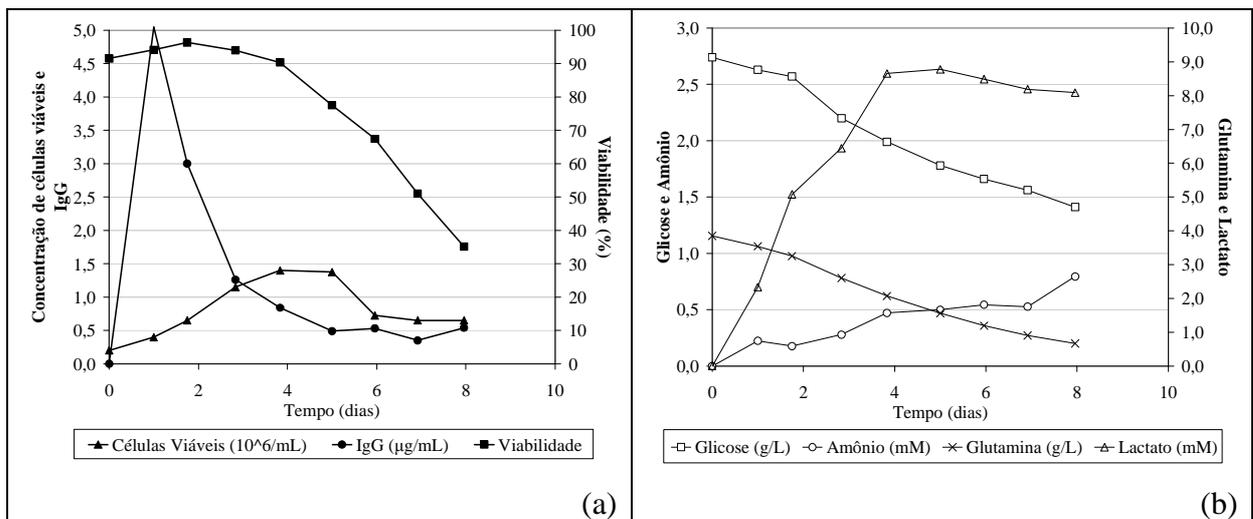


Figura 4.14: Perfil de crescimento do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em frascos *spinner* a 50 rpm (média das duplicatas dos cultivos), inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm, em meio Ex-Cell para hibridomas, incluindo a viabilidade celular (a), produção de anticorpo (IgG) (a), consumo de glicose e glutamina (b) e produção de amônio e lactato (b).

Observando-se o cultivo em sistemas agitados, nota-se que, nos cultivos em garrafas *roller* a 4 rpm (inoculadas diretamente dos frascos T, Figuras 4.5a e b), a agitação parece ter atuado negativamente sobre a concentração de células viáveis e viabilidade celular, mesmo em presença de SFB, suplementando o meio DMEM. Quando foi realizada a adaptação durante 24 horas em cada velocidade utilizada para adaptação das células à agitação, antes do inóculo inicial do cultivo, a concentração de células viáveis alcançou níveis semelhantes aos encontrados nos frascos T. A viabilidade celular foi mantida acima de 50% até o sétimo dia de cultivo com o uso do meio Ex-Cell e até o sexto dia, com o uso do meio DMEM.

Nos cultivos em frascos *spinner*, onde não houve adaptação das células à agitação antes do inóculo, as células sobreviveram somente até o quarto dia de cultivo e, com adaptação à agitação em garrafas *roller* até 16 rpm, somente até o quinto dia de cultivo. Nos cultivos em frascos *spinner*, onde as células foram adaptadas à agitação em garrafas *roller* até 32 rpm, a adaptação parece ter sido eficiente, já que a concentração de células viáveis ultrapassou

2 milhões de células por mililitro e a viabilidade celular se manteve acima de 50% até o sexto dia de cultivo em meio DMEM adicionado de 10% de SFB e até o décimo dia de cultivo em meio Ex-Cell.

Comparando-se as Figuras 4.11 e 4.12 com 4.13 e 4.14, observa-se que a adaptação em garrafas *roller* até 40 rpm não levou a nenhum aumento de viabilidade celular, sendo que, nos cultivos mostrados nas Figuras 4.13 e 4.14, a viabilidade celular decresceu mais rapidamente que nos cultivos mostrados nas Figuras 4.11 e 4.12. Isto pode se dever ao maior tempo levado para adaptação à agitação, que pode ter aumentado o estresse sobre as células ou por outro fator não conhecido. Alguns autores, estudando o efeito da agitação e aeração em cultivo de células animais, relataram que, quando expostas a maiores forças hidrodinâmicas, estas células costumam ativar seus mecanismos de apoptose (Chist, 1993; Al-Rubeai *et al.*, 1994a; Al-Rubeai *et al.*, 1994b). Nollert e colaboradores (1991) observaram que células animais respondem ao estresse físico alterando sua taxa de crescimento, morfologia, metabolismo e expressão gênica, podendo aumentar a produção da proteína de interesse. O resultado observado neste trabalho poderia ser decorrente de algum fenômeno deste tipo ou da diferença observada entre a viabilidade celular dos inóculos utilizados para a realização dos cultivos em *spinner*, utilizando células adaptadas a 32 e a 40 rpm. No primeiro, a viabilidade celular após a adaptação até 32 rpm (96 horas após o início da adaptação) estava a 97,5% e 98,5%, nos meios DMEM e Ex-Cell, respectivamente. No experimento de adaptação até 40 rpm (120 horas após o início da adaptação), a viabilidade estava um pouco mais baixa (85 e 88 %, DMEM e Ex-Cell, respectivamente), o que pode significar que as células já estariam em fase estacionária ou de morte celular.

Do mesmo modo como discutido no item 4.1, as Figuras 4.4b a 4.14b mostram que a queda da concentração de células viáveis e da viabilidade celular parecem estar associadas à queda da concentração de nutrientes (glicose e glutamina) e ao aumento da concentração de metabólitos (amônio e lactato). A Tabela 4.4 mostra, de forma comparativa, as diversas variáveis selecionadas ao metabolismo, para os cultivos realizados em sistemas agitados.

Tabela 4.4: Resultados da concentração máxima de células ($X_{\text{máx}}$), taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d), quantidade máxima de produto ($P_{\text{máx}}$), produtividade volumétrica máxima ($P_{V,\text{Máx}}$) e dos coeficientes de rendimento – $Y_{X/\text{glc}}$, $Y_{X/\text{gln}}$, $Y_{P/X}$, $Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$, $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$, $Y_{P/\text{glc}}$, $Y_{P/\text{gln}}$, $Y_{P/X}$ – em spinner e em garrafa roller, nas rotações utilizadas para adaptação, com os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e Ex-Cell (Sigma).

	<i>Roller</i> DMEM 40 rpm	<i>Roller</i> Ex-Cell 40 rpm	<i>Spinner</i> DMEM (16 rpm)	<i>Spinner</i> DMEM (32 rpm)	<i>Spinner</i> Ex-Cell (32 rpm)	<i>Spinner</i> DMEM (40 rpm)	<i>Spinner</i> Ex-Cell (40 rpm)
$X_{\text{máx}}$ ($10^6/\text{mL}$)	1,1	3,9	1,7	2,1	2,0	1,6	1,4
$P_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,4	0,3	1,0	0,7	1,0	0,8	5,1
$P_{V,\text{Max}}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{d}$)	0,2 (24 h)	0,2 (22 h)	1,1 (22 h)	0,3 (27 h)	3,5 (27 h)	0,5 (42 h)	5,1 (24 h)
μ_{exp} (1/h)	0,021	0,034	0,030	0,030	0,019	0,031	0,021
t_d (h)	33,78	20,29	22,83	22,87	37,03	22,15	32,77
$Y_{X/\text{glc}}$ ($10^6\text{cél}/\text{g}$)	1,005	2,332	1,586	1,994	1,731	2,348	1,600
$Y_{X/\text{gln}}$ ($10^6\text{cél}/\text{g}$)	0,253	1,352	0,557	0,478	0,766	0,771	0,674
$Y_{P/\text{glc}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,344	0,206	0,909	0,593	0,904	1,337	1,107
$Y_{P/\text{gln}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,087	0,120	0,319	0,142	0,400	0,439	0,466
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g}/10^6\text{cél}$)	0,3	0,1	0,6	0,3	0,5	0,6	0,7
$Y_{\text{NH}_4/\text{gln}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,104	0,237	0,116	0,092	0,116	0,092	0,264
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0,586	0,672	0,786	0,639	0,790	0,577	1,153

4.3 Comparação do cultivo de hibridomas e produção de anticorpo em meio de cultivo adicionado de SFB e livre de soro

Neste item, parte dos resultados apresentados nos itens 4.1 e 4.2 será **reapresentada**, de forma a destacar as diferenças geradas no cultivo celular e na produção de anticorpo pela utilização dos meios de cultivo DMEM e Ex-Cell. Desta forma, foram selecionados os experimentos onde o mesmo sistema de cultivo foi testado com os dois meios de cultivo.

Os resultados estão mostrados na Figura 4.15 (a-j), que apresenta os perfis comparativos do crescimento e da produção de anticorpos do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado nos diferentes sistemas de cultivo em meio DMEM com 10% de SFB e em meio Ex-Cell para hibridomas (Sigma).

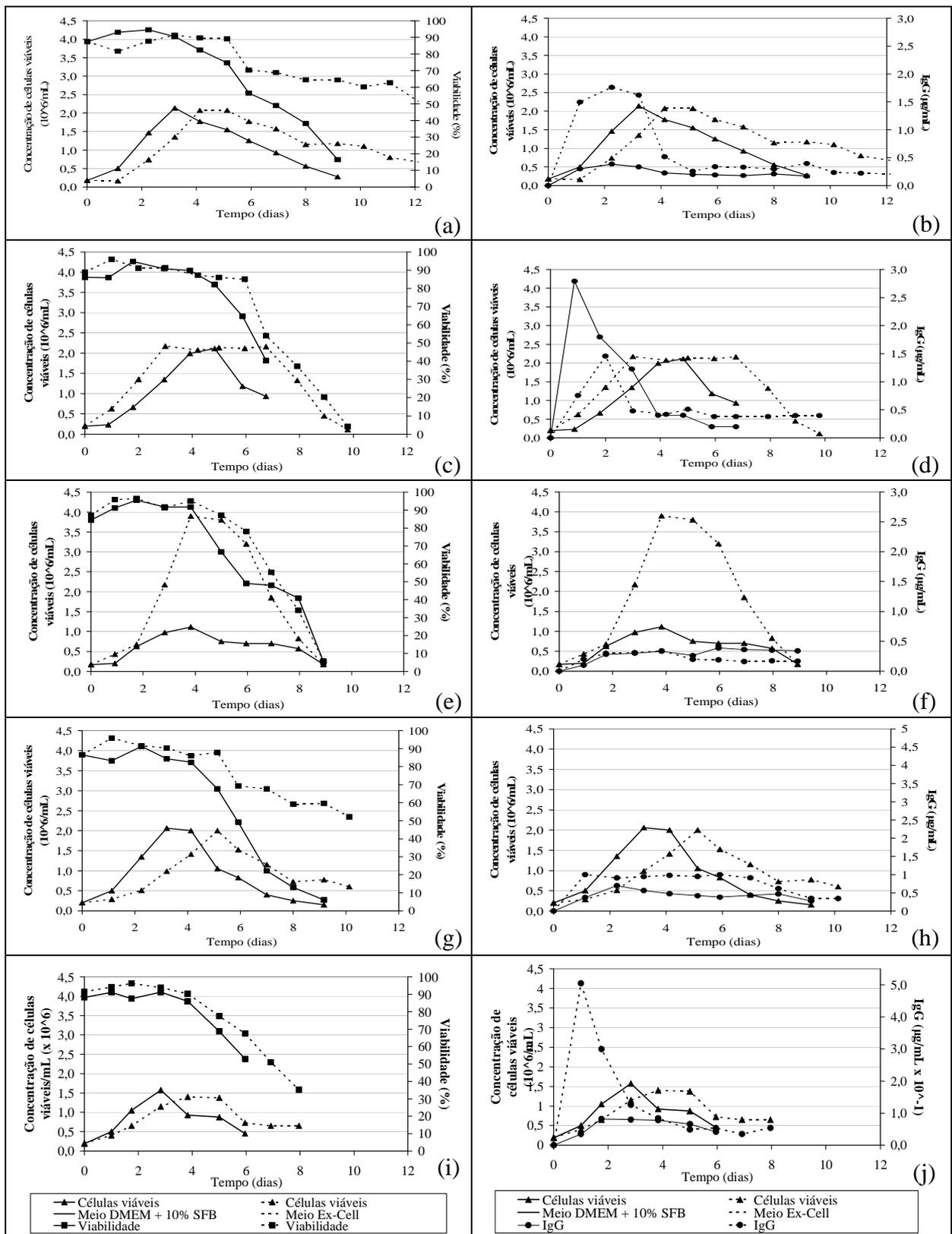


Figura 4.15: Perfis comparativos do crescimento (\blacktriangle) do hibridoma anti-dengue tipo 2 cultivado em: frascos T (a e b), garrafas *roller* a 16 rpm (c e d) e a 40 rpm (e e f); frascos *spinner* a 50 rpm inoculados com células adaptadas garrafas *roller* a 32 rpm (g e h) e inoculados com células adaptadas em garrafas *roller* a 40 rpm (i e j). Viabilidade celular (\blacksquare) e produção de anticorpo (IgG) (\bullet); meio DMEM com 10% de SFB (—) e meio Ex-Cell (---) (média das duplicatas dos cultivos).

Os resultados mostram que, no cultivo em frascos T, em garrafas *roller* a 16 rpm e em frascos *spinner* a 50 rpm, inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 32 rpm, a concentração de células viáveis (\blacktriangle) alcançou níveis semelhantes nos cultivos com os dois meios, mas o meio Ex-Cell demonstrou ter fornecido mais condições para que o cultivo pudesse ser mantido por mais tempo e com maior viabilidade celular (\blacksquare).

No cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm, a concentração de células viáveis alcançou níveis significativamente superiores no meio Ex-Cell do que do DMEM com 10% de SFB, mas o perfil da viabilidade celular foi semelhante nos dois meios.

No cultivo em frascos *spinner* a 50 rpm, inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm (Figura 4.15 i-j), a concentração de células viáveis (\blacktriangle) permaneceu em níveis baixos nos dois meios e a viabilidade celular (\blacksquare) caiu rapidamente a partir de 5 dias de cultivo.

Os resultados de μ_{exp} tenderam a ser mais altos e t_d tendeu a ser mais baixo nos sistemas utilizados com meio Ex-Cell, se comparado ao meio DMEM suplementado com SFB. A exceção ocorre quando a comparação é feita nos cultivos em *spinner*, pois, neste caso, devido ao maior estresse físico, o SFB pode ter fornecido proteção às células ao cisalhamento (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Resultados das taxas específicas de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e coeficiente de rendimento de célula em produto ($Y_{P/X}$) nos dois meios de cultivo utilizados neste trabalho.

	Frasco T DMEM	Frasco T Ex-Cell	Roller DMEM 16 rpm	Roller Ex-Cell 16 rpm	Roller DMEM 40 rpm	Roller Ex-Cell 40 rpm	Spinner DMEM (32 rpm)	Spinner Ex-Cell (32 rpm)	Spinner DMEM (40 rpm)	Spinner Ex-Cell (40 rpm)
μ_{exp} (1/h)	0,033	0,035	0,029	0,033	0,021	0,034	0,030	0,019	0,031	0,021
t_d (h)	21,33	19,59	23,51	20,91	33,78	20,29	22,87	37,03	22,15	32,77
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g}/10^6\text{cél}$)	0,2	0,5	1,9	0,2	0,3	0,1	0,3	0,5	0,6	0,7

Os resultados obtidos indicam que o melhor desempenho obtido com o meio Ex-Cell pode estar associado ao fato deste conter uma concentração inicial de glicose superior, a qual parece manter a viabilidade celular por mais tempo. Além disto, meios de cultivo de composição definida costumam conter outros suplementos, de composição e concentração otimizadas pela empresa detentora da patente, capazes de substituir com sucesso e, até mesmo, superar as propriedades do SFB.

No que se refere à produção de anticorpo, os resultados não parecem esclarecer qual dos dois meios de cultivo utilizados pode ser mais estimulante para a obtenção deste produto. Nos

cultivos em frasco T e em frascos *spinner*, o meio Ex-Cell parece gerar maior concentração de anticorpo logo no primeiro dia de cultivo, mas em todos os casos ocorre uma queda brusca de concentração no segundo ou terceiro dia. Já nas garrafas *roller*, com 16 rpm, o meio DMEM adicionado de 10% de SFB, gerou maior produção de anticorpo logo no primeiro dia de cultivo, mas também ocorreu uma queda brusca de concentração nas 48 horas seguintes. Este resultado foi seguido pela produção de anticorpo observada no mesmo sistema quando cultivado em meio Ex-Cell ($q_p = 0,2075$), o que, mais uma vez indica que os meios de cultivo não parecem diferir significativamente no que se refere à produção de anticorpo.

Meios livres de soro, como o Ex-Cell, são desenvolvidos e testados há mais de 20 anos. Diferentemente do que foi observado no presente trabalho, na literatura a concentração celular chega a aumentar em seis vezes e a produção em até quatro vezes se comparadas ao cultivo em meio com SFB (Merten *et al.*, 1994). van der Valk e colaboradores (2004) também observaram que meios livres de soro, como o Ex-Cell usado neste trabalho, podem chegar gerar maior crescimento celular que os meios adicionados de SFB.

Meios sem soro quimicamente definidos podem ser desenvolvidos com precisão na suplementação com reagentes quali- e quantitativamente adequados para cada linhagem celular, pois o conhecimento de biologia celular e bioquímica e os equipamentos com grande quantidade de recursos permitem uma avaliação cada vez mais precisa das respostas celulares. O uso de proteínas recombinantes ainda permite que não haja fonte de variação ou contaminação em sua origem.

As vantagens de se trabalhar com meio sem soro foram também avaliadas por Huang *et al.* (2008), que trabalharam com algumas linhagens celulares, inclusive com o hibridoma L243 secretor de IgG. Eles testaram uma lactoferrina recombinante como suplemento em meios sem soro que, em concentrações ideais diferentes para cada linhagem celular testada, foi capaz de triplicar o crescimento celular e a produção de anticorpos no hibridoma L243.

Para corroborar a idéia de que o uso de suplementação do meio de cultivo com SFB não resulta em alteração significativa no metabolismo de hibridomas, pode-se também citar o trabalho de Schneider (1989), que cultivou hibridomas em meios livres de soro e suplementados com porcentagens diferentes de SFB, tendo observado que este suplemento não aumentou significativamente o crescimento celular ou a secreção de anticorpos.

De forma diferente, Genzel e colaboradores (2006) mostraram em seus experimentos em garrafas *roller*, utilizando células MDCK, que em meios livres de soro as taxas de consumo de glicose e produção de lactato são claramente menores do que as obtidas em meios contendo SFB. No que se refere ao metabolismo da glutamina, foi observado que, no meio sem soro, as concentrações de amônio produzidas foram menores que no meio com SFB.

Estes pesquisadores também mostraram que, em meios contendo SFB, o crescimento celular e a produção de vírus foi maior do que em meios livres deste suplemento.

É importante destacar que, do mesmo modo como observado nos resultados deste trabalho, Koo e colaboradores (2009) observaram que, quando adaptadas ao meio livre de soro, células CHO mantiveram suas concentrações em alto nível e mantiveram sua viabilidade por mais tempo. Além disto, alcançaram maiores concentrações da proteína de interesse em meio livres de soro, mas também apenas durante o período de alta viabilidade celular.

4.4 Comparação do cultivo de hibridomas e produção de anticorpo entre os sistemas de cultivo utilizados

Neste item, parte dos resultados apresentados nos itens 4.1 e 4.2 será novamente **reapresentada** de forma a facilitar a observação das diferenças geradas no cultivo celular e na produção de anticorpo pelos três sistemas de cultivo utilizados: frascos T, garrafas *roller* e frascos *spinner*. Nas garrafas *roller* e nos frascos *spinner*, foram selecionadas as condições onde o hibridoma apresentou maior secreção de IgG (produto).

Na Figura 4.16 observa-se que, independente do sistema de cultivo utilizado, ocorreu pouca variação no crescimento celular.

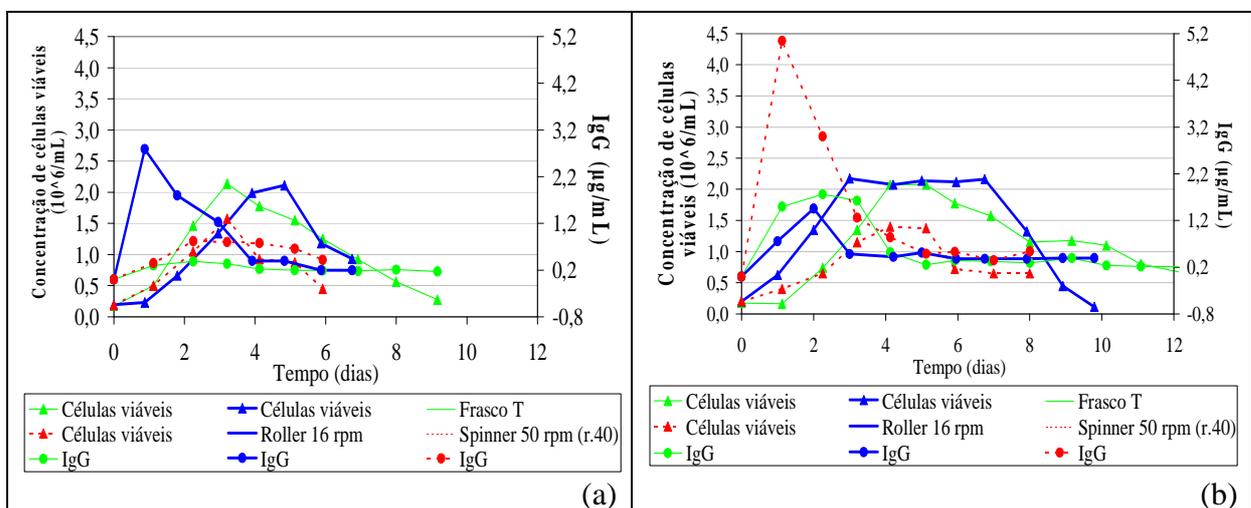


Figura 4.16: Perfis comparativos do crescimento (\blacktriangle) e produção de anticorpo (IgG) (\bullet) do hibridoma anti-dengue tipo 2, cultivado em frascos T (—), garrafas *roller* a 16 rpm (—) e frascos *spinner* a 50 rpm, inoculados com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm (---) (média das duplicatas dos cultivos) em meio DMEM com 10% de SFB (a) e em meio Ex-Cell para hibridomas (b).

Quanto à obtenção do anticorpo monoclonal em meio DMEM com SFB, observa-se que o sistema *roller* a 16 rpm apresentou o melhor desempenho, obtendo-se com este sistema maiores níveis de produção. Nos outros dois sistemas de cultivo, a produção do anticorpo

monoclonal neste meio permaneceu com valores muito baixos (Figura 4.16a). Entretanto, para o meio Ex-Cell, a produção máxima de IgG não diferiu muito entre o cultivo em frasco T e *roller*, sendo, contudo, inferior para o cultivo em *spinner*, conforme pode ser observado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Resultados das taxas específicas de crescimento celular (μ_{exp}), tempo de duplicação (t_d) e concentração máxima de produto ($P_{\text{máx}}$) nos três sistemas de cultivo utilizados neste trabalho.

	Frasco T DMEM	Frasco T Ex-Cell	Roller DMEM 16 rpm	Roller Ex-Cell 16 rpm	Spinner DMEM (40 rpm)	Spinner Ex-Cell (40 rpm)
μ_{exp} (1/h)	0,033	0,035	0,029	0,033	0,031	0,021
t_d (h)	21,33	19,59	23,51	20,91	22,15	32,77
$P_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	0,385	1,761	2,792	1,456	0,820	5,047

Kallel e colaboradores (2002) cultivaram células BHK-21 C13 para obtenção do vírus da raiva, adaptadas ao crescimento em meios livres de soro, incluindo dois tipos de meio Ex-Cell. Ao cultivar as células em frascos T, os autores obtiveram concentrações celulares superiores a 1 milhão de células por mililitro. Em *spinner*, a 30 rpm, as concentrações celulares alcançaram 2 milhões de células por mililitro. Quanto à produção de vírus, foi observado que esta acompanhou o crescimento celular, decaindo juntamente com a concentração de células. No que se refere aos resultados obtidos no presente trabalho com meio de cultivo sem soro, os mesmos parecem estar de acordo com os de Kallel e colaboradores (2002).

Jeffs e colaboradores (2006) compararam o cultivo de células CHO UG21 secretoras de gp140 – glicoproteína de envelope do vírus HIV-1 – em frascos T de 175 cm², garrafas *roller* (com e sem superfície expandida) e frascos *spinner*, utilizando meios Ex-Cell livres de SFB e livres de proteína, e também suplementados com 0,5% de SFB. Seus resultados mostraram que, para esta linhagem celular, o crescimento celular estava diretamente associado à produtividade de gp140. Sendo a linhagem CHO utilizada, altamente aderente, os melhores resultados foram encontrados com a utilização de frascos T, cultivadas em meio suplementado com SFB, seguidos pelos resultados obtidos em garrafas *roller* com superfície expandida, também em meio suplementado com SFB. No caso de frascos *spinner*, o uso de meio livre de SFB propiciou melhores resultados do que aquele suplementado com soro. Tais resultados mostram que, para linhagens de células altamente aderentes, os sistemas agitados só apresentam melhor produtividade na ausência de SFB, já que os fatores de adesão fornecidos

pelo soro são significativos para o crescimento celular e, conseqüentemente, para a produção da molécula de interesse. No presente trabalho, utilizando células de hibridoma pouco ou não aderentes, observou-se o crescimento celular, avaliado através de μ_{exp} , foi aproximadamente equivalente nos três sistemas de cultivo, quando se utilizou o meio DMEM com SFB, porém, em meio Ex-Cell livre de soro, decaiu significativamente em cultivo em *spinner*.

Shibuya *et al.* (2008) demonstraram que a produção de anticorpo está diretamente ligada ao crescimento celular. Desta forma, utilizando meio livre de soro em cultivo em batelada alimentada, eles alcançaram 400 mg/L de anticorpo, o que, no trabalho por eles realizado, corresponde a cinco vezes o obtido no cultivo em batelada em meio suplementado com soro. O presente trabalho, apesar de apresentar níveis de produto muito mais baixos, também parece indicar (com exceção do experimento conduzido em *roller* com meio DMEM) que o meio livre de soro estimula maior produção de anticorpo que o meio com soro e durante a fase de crescimento celular.

4.5 Comparação da avaliação da produção de anticorpo segundo dois métodos de análise

Ao longo de todo o trabalho, as concentrações de produto foram determinadas utilizando um *kit* de detecção de IgG de camundongos. Contudo, um ensaio de PRNT com amostras de um mesmo cultivo (*roller* em meio Ex-Cel a 40 rpm) foi realizado para confirmação do anticorpo produzido pelo hibridoma cultivado neste trabalho. Como o ensaio de neutralização é realizado especificamente contra o vírus do dengue tipo 2, os resultados obtidos indicam se o anticorpo avaliado é realmente específico para este vírus.

O ensaio de PRNT apresentou altos títulos de anticorpos – acima de 1:1000 – superiores ao soro utilizado como controle positivo do teste, indicando que, além de específico para o vírus do dengue 2, a produção de anticorpos foi significativa.

Novos ensaios de PRNT deverão ser realizados para avaliar todos os sistemas e meios de cultivo.

4.6 Comparação da produção de anticorpo *in vivo* e *in vitro*

Amostras de três lotes de fluido ascítico anti-dengue tipo 2 foram analisadas pelo *kit* de dosagem de IgG de camundongo (Pierce) e os resultados comparados com os obtidos nos cultivos realizados neste trabalho.

Os lotes de fluido ascítico apresentaram dosagens de 54, 78 e 41 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as maiores dosagens de anticorpo encontradas nos experimentos deste trabalho foram de 2,8 $\mu\text{g/mL}$, nos cultivos em sistema *roller* a 16 rpm, em meio DMEM, e 5,1 $\mu\text{g/mL}$ no sistema *spinner*, inoculado com células adaptadas ao cultivo em garrafas *roller* a 40 rpm, em meio Ex-Cell. Tais resultados indicam que a produção de anticorpos em fluido ascítico é de 10 a 26 vezes superior que nos cultivos *in vitro*.

Apesar das concentrações mais elevadas de anticorpo obtidas *in vivo*, o volume de fluido ascítico obtido por camundongo ao final de todas as drenagens (3-4) situa-se na faixa de 9-20 mL. Já o volume de sobrenadante de cultivo obtido em cada *roller* e *spinner* neste trabalho foi de 300 e 100 mL, respectivamente.

Esses volumes de sobrenadante resultam, em cada *roller* a 16 rpm com meio DMEM, em uma produção de 0,84 mg (840 μg) do anticorpo, ou 0,51 mg (510 μg) em *spinner* com meio Ex-Cell (Tabela 4.7).

Isto demonstra a viabilidade de substituição da produção *in vivo* pela obtenção da IgG em sistemas agitados. Se consideradas também as desvantagens da produção *in vivo*, como: baixo rendimento, alto custo, risco de contaminação do produto, presença de proteínas não específicas, variações significativas na composição entre os fluidos ascíticos (relacionadas no item 1.2.1), pode-se concluir que o cultivo do hibridoma anti-dengue 2 em frascos agitados é altamente promissor.

Tabela 4.7: comparação da produção de anticorpo *in vivo* (fluido ascítico) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo).

Fluido Ascítico	Sobrenadante de Cultivo
54, 78 e 41 $\mu\text{g/mL}$	2,8 e 5,1 $\mu\text{g/mL}$
10 mL	300 e 100 mL (<i>roller</i> e <i>spinner</i>)
(\bar{X}) 580 μg	840 e 510 μg (<i>roller</i> e <i>spinner</i>)

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Baseando-se nos resultados discutidos no tópico anterior, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- 1) Foi possível realizar o cultivo do hibridoma secretor do anticorpo anti-dengue tipo 2 em meio livre de soro animal sem necessidade de adaptação celular a estas condições.
- 2) Comparando-se os resultados dos cultivos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB com aqueles obtidos com o meio livre de soro (Ex-Cell HighTiter, Sigma), observa-se que este último forneceu melhores condições para o cultivo celular, mantendo uma alta viabilidade celular por um período maior de tempo nos três sistemas de cultivo testados e propiciando, na maioria dos experimentos, uma maior formação de produto (IgG).
- 3) A redução nas concentrações de nutrientes (glicose e glutamina) e o acúmulo de metabólitos (lactato e amônio) conduziram a uma queda na concentração e na viabilidade celular nos cultivos realizados.
- 4) A avaliação dos diferentes sistemas de cultivo mostrou que o melhor crescimento e viabilidade celular foram obtidos em garrafas *roller* a 40 rpm, em meio Ex-Cell.
- 5) Quanto à comparação da produção de IgG entre os sistemas de cultivo testados, a maior concentração obtida deste anticorpo ocorreu em frascos do tipo *spinner* a 50 rpm (após adaptação em garrafas *roller* até 40 rpm), em meio Ex-Cell e em garrafas *roller* a 16 rpm, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB.
- 6) A maior produção de anticorpos ocorreu na fase exponencial de crescimento celular. Contudo, de forma surpreendente, esta produção sofreu rápido declínio durante as fases subsequentes do cultivo.
- 7) As concentrações de IgG dos lotes de fluido ascítico foram 10 a 20 vezes maiores que as obtidas no cultivo *in vitro*.
- 8) A produção do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 *in vitro* pode ser considerada viável, pois o volume de sobrenadante contendo estes anticorpos obtido em cultivos em pequena escala, utilizando sistemas de cultivo de fácil manipulação, é até 100 vezes maior que o volume de fluido ascítico obtido de camundongo.

Com base nos resultados e conclusões obtidos no presente trabalho, sugere-se como atividades futuras:

- ✓ Realizar experimentos adicionais com os sistemas de cultivo *in vitro* que apresentaram os melhores resultados neste trabalho, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do

processo e de determinar as condições operacionais ótimas para maximização da obtenção de anticorpos monoclonais anti-dengue tipo 2.

- ✓ Avaliar o cultivo dos hibridomas e a produção de anticorpos monoclonais em sistemas que mantenham as células sempre em fase exponencial de crescimento, como, por exemplo, o sistema MiniPERM.
- ✓ Realizar estudos de estabilidade e qualidade do produto.
- ✓ Estudar as condições de cultivo utilizando outros meios livres de soro.
- ✓ Estabelecer novas metodologias de quantificação do anticorpo específico.
- ✓ Consolidar uma plataforma tecnológica baseada no cultivo *in vitro* de hibridomas em sistemas agitados utilizando meios de cultivo livres de soro animal, que possibilite a redução do número de animais utilizados, com o objetivo de minimizar os gastos envolvidos na obtenção de anticorpos monoclonais do banco de hibridomas do Latam.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Imunologia Celular e Molecular**, Editora Revinter Ltda, Rio de Janeiro; 2000.

Al-Rubeai M, Singh RP, Goldman MH, Emery AN. **Death mechanism of animal cells in conditions of intensive agitation**. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994a; 45(6): 463-472.

Al-Rubeai M, Singh RP, Goldman MH, Emery AN, Zhang Z. **Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces**. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994b; 46(1): 88-92.

Altamirano C, Gòdia F, Cairo JJ. **Metabolismo de células de mamíferos cultivadas in vitro**, In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Editora Roca, São Paulo; 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária [on line]. **Resolução - RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003**. 2003 [capturado em 10 jun. 2009] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/210_03rdc.pdf

Augusto EFP, Barral MF, Piccoli RAM. **Modelos de crescimento e formação de produtos no cultivo de células animais**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Editora Roca, São Paulo; 2008.

Avgerinos GC, Drapeau D, Socolow JS. **Spin filter perfusion system for high density cell culture: production of recombinant urinary type plasminogen activator in CHO cells**. *BioTechnology*, 1990; 8: 54-58.

Barreto FR, Teixeira MG, Costa MCN, Carvalho MS, Barreto ML. **Spread pattern of the first dengue epidemic in the city of Salvador, Brazil**. *BMC Public Helth*, 2008; 8(51): 1-20.

Berson RE, Friederichs G. **A self-feeding roller bottle for continuous cell culture**. *Biotechnology Progress*, 2008; 24(1): 154-157.

BD Falcon [on line] **Culture flasks**. 2009 [capturado em 1 abr. 2009] Disponível em: http://www.bdbiosciences.com/nvCategory.jsp?action=SELECT&form=formTree_catBean&item=720948

Biomanguinhos (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos) – Fundação Oswaldo Cruz [on line]. **Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Detecção de Imunoglobulina M Anti-Dengue**. 2007 [capturado em 13 jul. 2007] Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/interna/pdf/BM_001_06bk%20eie%20dengue.pdf

Birch JR, Racher AJ. **Antibody production**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006; 58: 671-685.

Borges MBJ, Kato SEM, Damaso CRA, Moussatché N, Freire MS, Passos SRL, Nascimento JP. **Accuracy and repeatability of a micro plaque reduction neutralization test for vaccinia antibodies**. *Biologicals*, 2008; 36: 105-110.

- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. **Production of functional chimaeric mouse human-antibody.** *Nature*, 1984; 312 (5995): 643-646.
- Bruce MP, Boyd V, Duch C, White JR. **Dyalysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice.** *Journal of Immunological Methods*, 2002; 264: 59-68.
- Bugarski B, King GA, Jovanovic G, Daugulis AJ, Goosen, MFA. **Performance of an external loop air-lift bioreactor for the production of monoclonal-antibodies by immobilized hybridomas cells.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989; 30(3): 264-269.
- Butler M. **Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005; 68: 283-291.
- Câmara FP, Theophilo RLG, Santos TG, Pereira SRF, Câmara, DCP, Matos RRC. **Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007; 40(20): 192-196.
- Castilho L, Medronho RA. **Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2002; 74: 129-169.
- Chang TH, Steplewski Z, Koprowski H. **Production of monoclonal antibodies en serum-free medium.** *Journal of Immunological Methods*, 1980; 39: 369-375.
- Chen K, Liu Q, Xie L, Sharp PA, Wang DIC. **Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production.** *Biotechnology and Bioengineering*, 2001; 72: 55–61.
- Chiarella P, Fazio VM. **Mouse monoclonal antibodies in biological research : strategies for high-throughput production.** *Biotechnology Letters*, 2008; 30(8): 1303-1310.
- Chico E., Rodríguez G, Figueiredo A. **Biorreatores para Células Animais**, In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Editora Roca, São Paulo; 2008.
- Chisti Y. **Animal cell culture in stirred bioreactors: Observations on scale-up.** *Process Biochemistry*, 1993; 28(8): 511-517.
- Chisti Y. **Animal-cell damage in sparged bioreactors.** *Trends in Biochemistry*, 2000: 1-15.
- Choo CY, Tian Y, Kim WS, Blatter E, Conary J, Brady CP. **High-level production of a monoclonal antibody in murine myeloma cells by perfusion culture using a gravity settler.** *Biotechnology Progress*, 2007; 23: 225-231.
- Chu L, Robinson DK. **Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.** *Current Opinion in Biotechnology*, 2001; 12(2): 180-187.
- Cole SPC, Campling BG, Atlaw T, Kozbor D, Roder JC. **Human monoclonal-antibodies.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1984; 62(2); 109-120.
- Corning. **Corning Life Sciences Selection Guide**, Issue 5, Corning Incorporated, USA, 2009.

Çayl A, Hirschmann F, Wirth M, Hauser H, Wagner R. **Cell lines with reduced UDP-N-acetylhexosamine pool in the presence of ammonium.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1999; 65: 192–200.

Darfler FJ. **A protein-free medium for the growth of hybridomas and other cells of the immune system.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1990; 26: 769-778.

Davis J. **Systems for cell culture scale-up**, In: Stacey G, Davis J (eds.), **Medicines From Animal Cell Culture**, Editora John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England; 2007.

Degallier N, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PF. **La dengue et ses vecteurs au Brésil.** *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1996; 89: 128–136.

De Masi F, Chiarella P, Wilhelm H, Massimi M, Belinda B, Ansorge W, Sawyer A. **High throughput production of mouse monoclonal antibodies using antigen microarrays.** *Proteomics*, 2005; 5(16): 4070-4081.

van Dijk MA, van de Winkel JGJ. **Human antibodies as next generation therapeutics.** *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001; 5(4): 368-374.

Dorka P, Fischer C, Budman H, Scharer, J. **Metabolic flux-based modeling of mAb production during batch and fed-batch operations.** *Bioprocess and Biosystems*, 2009; 32(2); 183-196.

Doyle A, Griffiths JB (eds.). **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology**, Editora John Wiley & Sons, Ltd, Biffins Lane Chichester West Sussex, England; 1998.

Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. **Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations.** *Trends in Biotechnology* 2006; 24(3): 105-108.

Falkenberg FW. **Production of monoclonal antibodies mini-PERM (TM) bioreactor: comparison with other hybridoma culture methods.** *Research in Immunology*, 1998; 149(6): 560-570.

Falkenberg FW, Weichert H, Krane M, Bartels I, Palme M, Nagels H-O, Fiebig H. **In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular mini-fermenter.** *Journal of Immunological Methods* 1995; 179: 13-29.

Federspiel G, McCullough KC, Kihm U. **Hybridoma antibody production in vitro in type II serum-free medium using Nutridoma-SP supplements.** *Journal of Immunological Methods* 1991; 145: 213-221.

Figueiredo LTM. **Febres hemorrágicas por vírus no Brasil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006; 39(2): 203-210.

Figueiredo RMP, Navega FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MPG, Costa CA, Farias IP. **Dengue virus type 4, Manaus, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, 2008; 14(40): 667-669.

Freshney RI, **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**, 4^a ed., Editora Wiley-Liss, Inc., Nova Iorque, NY, EUA; 2000.

Fries S, Glazomitsky K, Woods A, Forrest G, Hsu A, Olewinski R. **Evaluation of disposable bioreactors rapid production of recombinant proteins by several animal cell lines.** *Bioprocess International, Supplement*, 2005; 10: 36-44.

Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE, Dalrymple JM. **Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1982; 31(3): 548-555.

Genzel Y, Fischer M, Reichl U. **Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture.** *Vaccine*, 2006; 24: 3261-3272.

Glacken MW, Fleischaker RJ, Sinskey AJ. **Reduction of waste product excretion via nutrient control – Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian-cells.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1986; 28(9): 1376-1389.

Glacken MW, Fleischaker RJ, Sinskey AJ. **Large-scale production of mammalian-cells and their products – Engineering principles and barriers to scale-up.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1983; 413: 355-372

Gould EA, Solomon T. **Pathogenic flaviviruses.** *Lancet*, 2008; 371: 500-509.

Greiner Bio-One. **Instruction Manual miniPERM**, Germany, 2007.

Greiner Bio-One [*on line*]. **CELL MASTER roller bottles.** 2009 [capturado em 15 mar. 2009] Disponível em:

[http://www.imprint.com.br/detProduto.php?codproduto=88&coddivisao=1&codproduto_categoria=2&codproduto_subcategoria=29&codproduto_tipo=34&caminho=PRODUTOS%C3%82%C2%A0%C3%82%C2%BB%C3%82%C2%A0GREINER%C2%A0%C2%BB%C2%A0Garrafa%20Roller%20\(tipo%20longa\)%20para%20Cultura%20Celular,%20em%20PS,%20est%C3%A9ril,%20%C3%A1rea%204250cm2&PHPSESSID=26bcd286635d027730ae3b9c59f72e78](http://www.imprint.com.br/detProduto.php?codproduto=88&coddivisao=1&codproduto_categoria=2&codproduto_subcategoria=29&codproduto_tipo=34&caminho=PRODUTOS%C3%82%C2%A0%C3%82%C2%BB%C3%82%C2%A0GREINER%C2%A0%C2%BB%C2%A0Garrafa%20Roller%20(tipo%20longa)%20para%20Cultura%20Celular,%20em%20PS,%20est%C3%A9ril,%20%C3%A1rea%204250cm2&PHPSESSID=26bcd286635d027730ae3b9c59f72e78)

Gubler DJ. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** *Clinical Microbiology Reviews*, 1998; 11(3): 480-496.

Hassell T, Gleave S, Butler M. **Growth-inhibition in animal-cell culture – The effect of lactate and ammonia.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991; 30(1): 29-41.

Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. **Dengue virus-specific and flavivirus groups determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1982; 31(4): 830-836.

Huang N, Bethell, D, Card C, Cornish J, Marchbank T, Wyatt D, Mabery K, Playford R. **Bioactive recombinant human lactoferrin, derived from rice, stimulates mammalian cell growth.** *In Vitro Cellular and Development Biology-Animal*, 2008; 44(10): 464-471.

Hundt B, Best C, Schlawin N, Kaßner H, Genzel Y, Reichl U. **Establishment of a milk enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave[®] Bioreactor microcarrier in 1-10 L scale.** *Vaccine*, 2007; 25: 3987-3995.

- Jain E, Kumar A. **Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters.** *Biotechnology Advances*, 2008; 26(10): 46-72.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. **Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença**, Editora Artmed, Porto Alegre; 2002.
- Jeffs SA, Goriup S, Stacey G. **Comparative analysis of HIV-1 recombinant envelope glycoproteins from different culture systems.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006; 72: 279-290.
- Johansson L, Klinth J, Holmqvist O, Ohlson S. **Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture?** *Cytotechnology*, 2003; 42: 67-74.
- Kallel H, Jouini A, Majoul S, Rourou S. **Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells.** *Journal of Biotechnology*, 2002; 95: 195-204.
- Kamil SM, Mohamad N H, Narazah M Y, Khan F A. **Dengue haemorrhagic fever with unusual prolonged thrombocytopenia.** *Singapore Medicine Journal* 2006; 47(4): 332-334.
- Keating J. **An investigation into the cyclical incidence of dengue fever.** *Social Science & Medicine*, 2001; 53: 1587–1597.
- King CC, Chao DY, Chien LJ, Chang GJJ, Lin TH, Wu YC, Huang JH. **Comparative analysis of full genomic sequence among different genotypes of dengue virus type 3.** *Virology Journal*, 2008; 5(63): 1-13.
- Knevelman C, Hearle DC, Osman JJ, Khan M. **Characterization and operation of a disposable bioreactor as a replacement for conventional steam-in-place inoculum bioreactors for mammalian cell culture processes.** *Abstracts of papers of the American chemical society*, 2002; 224: U233
- Köhler G, Milstein C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Journal of Immunology*, 2005: 2453-2455. Reprinted with permission from *Nature*, 1975; 256: 495-497.
- Koo TY, Park JH, Park HH, Park, TH. **Beneficial effect of 30Kc6 gene expression on production of recombinant interferon- β in serum-free suspension culture of CHO cells.** *Process Biochemistry*, 2009: 146-153.
- Kumar S, Wittmann C, Heinzle E. **Minibioreactors.** *Biotechnology Letters*, 2004; 26(1): 1-10.
- Kuchler, RJ, **Biochemical methods in cell culture and virology.** Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, USA; 2000.
- Kwong CW, Hsieh JH, Syu MJ, Chou SS. **Anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibody IgM production in suspension and immobilized cell bioreactors.** *Biotechnology Letters*, 1989; 11(6): 377-382.
- Legazpi L, Díaz J, Laca A, Díaz M. **Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: substrate and agitation effect.** *Biochemical Engineering Journal* 2005; 26: 112-130.

Léo P, Galesi LLG, Suazo CAT, Moraes AM. **Cultivos celulares: conceitos básicos.** In: Moraes A.M., Augusto E.F.P., Castilho L.R. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Editora Roca, São Paulo, 2008.

Lidenbach BD, Rice CM. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** In: Knipe DM, Howley PM (eds.), **Fields' Virology**, 4^a ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; 2001.

Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Odonnell SL, Lapachet ESG, Bengoechea T, Fishwild DM, Carmack CE, Kay RM, Huszar D. **Antigen-specific human-antibodies from mice comprising 4 distinct genetic modifications.** *Nature*, 1994; 368(6474): 856-859.

Lonberg N. **Human antibodies from transgenic animals.** *Nature Biotechnology*, 2005; 23: 1117-1125.

Malavige GN, Velathanthiri VGNS, Wijewickrama ES, Fernando S, Jayaratne SD, Aaskov J, Seneviratne SL. **Patterns of disease among adults hospitalized with dengue infections.** *QJM: An International Journal of Medicine*, 2006; 99: 299-305.

Mariani E, Mariani AR, Mônico MCG, Lalli E, Vitale M, Facchini A. **Commercial serum-free media: hybridoma growth and monoclonal antibody production.** *Journal of Immunological Methods*, 1991; 145: 175-183.

Martin Y, Vermette P. **Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances.** *Biomaterials*, 2005: 7481-7503.

Martins FSV, Castineiras TMPP [on line]. **Dengue – Cives – Centro de Informação em Saúde para Viajantes – UFRJ.** 2007 [capturado em 16 jul. 2007] Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/dengue/den-iv.html>

McQueen A, Bailey JE. **Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1990; 35: 1067-1077.

Mel M, Rafiz A, Rahman A, Salleh MRM, Hasihim YZHY. **Monoclonal antibody production: viability improvement of RC1 hybridoma cell in different types of bioreactor.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008; 24: 1923-1927.

Mellado MCM, Castilho LR. **Proteínas recombinantes terapêuticas.** In: Moraes A.M., Augusto E.F.P., Castilho L.R. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Editora Roca, São Paulo; 2008.

Medronho RA. **Dengue e o ambiente urbano.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2006; 9(2): 159-61.

Medronho RA. **Challenges for dengue control in Brazil.** *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2008; 24(5): 948-949.

Mercille S, Massie B. **Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1994; 44(9): 1140-1154.

Mercille S, Johnson M, Lanthier S, Kamen AA, Massie B. **Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates.** *Biotechnology and Bioengineering*, 2000; 67(4): 435-450.

Merten OW, Kierulff JV, Castignolles N, Perrin P. **Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines.** *Cytotechnology*, 1994; 14: 47-59.

Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. **Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. glucose pulse and step changes.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1988a; 33(4): 477-486.

Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. **Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: II. glutamine pulse and step changes.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1988b; 33(4): 487-499.

Ministério da Saúde – Fundação Nacional de Saúde [on line]. **Programa Nacional de Controle da Dengue.** 2002 [capturado em 13 jul. 2007] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncd_2002.pdf

Moraes AM, Mendonça RZ, Suazo CAT. **Meios de cultura para células animais.** In: Moraes A.M., Augusto E.F.P., Castilho L.R. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Editora Roca, São Paulo; 2008.

Morrison RT, Lyster DM, Alcorn L, Rhodes BA, Breslow K, Burchiel SW. **Radioimmunoimaging with TC-99M monoclonal-antibodies – clinical studies.** *International Journal of Nuclear Medicine and Biology*, 1984; 11(2): 184-188.

Murhammert DW, Goochee CF. **Structural features of nonionic polyglycol polymer-molecules responsible for the protective effect in sparged animal-cell bioreactors.** *Biotechnology Progress*, 1990; 6(2): 142-148.

Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. **Monoclonal antibodies.** *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 2000; 53: 111-117.

Nienow AW. **Reactor engineering in large scale animal cell culture.** *Cytotechnology*, 2006; 50: 9-33.

Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr, HG. **Dengue viruses in Brazil, 1986-2006.** *Pan American Journal of Public Health*, 2007; 22(5): 358-363.

Nollert MU, Diamond SL, McIntire LV. **Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1991; 38(6): 588-602.

Nunc. **Nunc Catalog.** NUNC Serving Life Science, USA; 2005.

Oh SKW, Vig P, Chua F, Teo WK, Yap MGS. **Substantial overproduction of antibodies by applying pressure and sodium butyrate.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1993; 42(5): 601-610.

Oliveira CZ. **Produção de anticorpos monoclonais para composição de reagents em kits de diagnóstico.** Monografia, Curitiba, UFPR; 2008.

OPAS. [on line] **Prevenção e controle da dengue nas Américas: enfoque integrado e lições aprendidas.** 2007 [capturado em 31 mar. 2008]. Disponível em: <http://www.paho.org/portuguese/gov/ce/ce140-17-p.pdf>.

Ozturk SS, Riley MR, Palsson BO. **Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody-production.** Biotechnology and Bioengineering, 1992; 39(4): 418-431.

Ozturk S, Palsson O. **Examination of serum and bovine serum albumin as shear protective agents in agitated cultures of hybridoma cells.** Journal of Biotechnology, 1991: 13-28.

Pasqualini R, Arap W. **Hybridoma-free generation of monoclonal antibodies.** Proceedings of Natural Academy of Science, 2004a; 101 (1) 257-259.

Pasqualini R, Arap W. **Method for ex vivo hybridoma-free production of polyclonal and monoclonal antibodies and generation of immortalized cell populations.** Patent WO/2004/092220, 2004b.

Pellegrini MP, Pinto RCV, Castilho LR. **Mecanismos de crescimento e morte de células animais cultivadas in vitro.** In: Moraes A.M., Augusto E.F.P., Castilho L.R. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Editora Roca, São Paulo; 2008.

Pohlscheidt M, Langer U, Minuth T, Bödeker B, Apeler H, Hörlein HD, Paulsen D, Waigmann HR. **Development and optimisation of a procedure for the production of *Parapoxvirus ovis* by large-scale microcarrier cell culture in a non-animal, non-human and non-plant-derived medium.** Vaccine, 2008; 26: 1552-1565.

Potter M, Pumphrey JG, Walters JL. **Growth of primary plasmacytomas in the mineral oil conditioned peritoneal environment.** Journal of the National Cancer Institute, 1972; 49(1): 305-308.

Premaratna R, Bailey MS, Ratnasena BGN, de Silva HJ. **Dengue fever mimicking acute appendicitis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2007; 101: 683-685.

Qi RF, Zhang L, Chi CW. **Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design.** Acta of Biochimica and Biophysica, 2008; 40(2): 91-101.

Rader C, Barbas CF. **Phage display of combinatorial antibody libraries.** Current Opinion Biotechnology, 1997; 8: 503-508.

Reichert JM, Rosensweig C J, Faben LB, Dewitz MC. **Monoclonal antibody successes in the clinic.** Nature Biotechnology, 2005; 23: 1073-1078.

Reichert J, Pavlou A. **Monoclonal antibodies market.** Nature Reviews Drug Discovery, 2004; 3(5): 383-384.

- Reuveny S, Velez D, Macmillan JD, Miller L. **Factors affecting monoclonal antibody production in culture.** *Developmental Biological Standards*, 1987; 66: 169-175.
- Roque ACA, Lowe CR, Taipa MA. **Antibodies and genetically engineered related molecules: Production and purification.** *Biotechnology Progress*, 2004; 20(3): 639-654.
- Russell P. K., Nisalak A., Sukhavachana P., Vivona S. **A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies.** *Journal of Immunology*, 1967; 99(2), 285-290.
- Ryll T, Dutina G, Reyes A, Gunson J, Krummen L, Etcheverry. **Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: Characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality.** *Biotechnology and Bioengineering*, 2000; 69(4): 440-449.
- Sawyer A, De Masi F. **Method for producing monoclonal antibodies.** Patent WO/2003/089471, 2003.
- Scharfenberg K, Wagner R. **A reliable strategy for the achievement of cell lines growing in protein-free medium,** In: Beavery ECB *et al.* (eds.). **Animal Cell Technology: Developments towards the 21st Century**, 619-623, 1995. Academic Publishers. Netherlands, 1995.
- Schlaeger EJ, Eggimann B, Gast A. **Proteolytic activity in the culture supernatants of mouse hybridoma cells.** *Developmental Biological Standards*, 1985; 66: 403-408.
- Schneider YJ. **Optimization of hybridoma cell-growth and monoclonal-antibody secretion in a chemically defined, serum-free and protein-free culture-medium.** *Journal of Immunological Methods*, 1989; 116(1): 65-77.
- Schneider YJ, Lavoix A. **Monoclonal antibody production in semi-continuous serum- and protein-free culture.** *Journal of Immunological Methods*, 1990; 129: 251-268
- Schneider M, Marison IW, von Stockar U. **The importance of ammonia in mammalian cell culture.** *Journal of Biotechnology*, 1996; 46(3): 161-185.
- Schönherr OT, van Gelder PTJA, van Hees PJ, van Os AMJM, Roelofs HWM. **A hollow fibre dialysis system for the in vitro production of monoclonal antibodies replacing in vivo production in mice.** *Developmental Biological Standards*, 1987; 66: 211-220.
- Sharfstein ST. **Advances in cell culture process development: tools and techniques for improving cell line development and process optimization.** *Biotechnology Progress*, 2008; 24; 727-734.
- Shibuya K, Haga R, Namba M. **A serum substitute for fed-batch culturing of hybridoma cells.** *Cytotechnology*, 2008; 57(2): 187-197.
- Siegel DL. **Recombinant monoclonal antibody technology.** *Transfusion Clinique et Biologique*, 2002; 9(1): 15-22.
- Sierra B, Alegre R, Pérez AB, García G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, Aguirre E, Mayling Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Valdés L, Kanki P, Guzmán G. **HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease:**

- Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection.** Human Immunology, 2007; 68: 531–540.
- Sinacore MS, Drapeau D, Adamson SR. **Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media.** Molecular Biotechnology, 2000; 15: 249-257.
- Singh V. **Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation.** Cytotechnology, 1999; 30(1-3): 149-158.
- Sommerfeld S, Strube J. **Challenges in biotechnology production – generic processes and process optimization for monoclonal antibodies.** Chemical Engineering and Processing, 2005; 44(10): 1123-1137.
- Sowana DD, Williams DRG, O’Neil BK, Dunlop EH. **Studies of the protective effects of pluronic F-68 on wild carrot cell cultures.** Biochemical Engineering Journal, 2002; 12(3): 165-173.
- Stacey G, Davis J (eds.), **Medicines From Animal Cell Culture**, Editora John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England; 2007.
- St. Groth SF. **Automated production of monoclonal antibodies in a cytostat.** Journal of Immunological Methods, 1983; 57(1-3): 121-136.
- Tamashiro DAA, Alarcon VB, Marikawa Y. **Ectopic expression of mouse Sry interferes with Wnt/beta-catenin signaling in mouse embryonal carcinoma cell lines.** Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 2008; 1780(12): 1395-1402.
- Tang YJ, Ohashi R, Hamel JFP. **Perfusion culture of hybridoma cells for hyperproduction of IgG_{2a} monoclonal antibody in a wave bioreactor-perfusion culture system.** Biotechnology Progress, 2007; 23: 255-264.
- Tharakan JP, Lucas A, Chau PC. **Hybridoma growth and antibody secretion in serum-supplemented and low protein serum-free media.** Journal of Immunological Methods, 1986; 94: 225-235.
- Torres JR, Castro J. **The health and economic impact of dengue in Latin America.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2007; 23(1): S23-S31.
- Trebak M, Chong JM, Herlyn D, Speicher DW. **Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology.** Journal of Immunological Methods, 1999; 230(1-2): 59-70.
- Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. **Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains.** Vaccine, 2001; 19(25-26): 3444-3450.
- van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M, Baumans V. **The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture.** Toxicology in Vitro, 2004; 18: 1-12.
- Veronesi R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Oitava Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 1991.

Voisard D, Meuwly F, Ruffieux PA, Baer G, Kadouri A. **Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells.** *Biotechnology and Bioengineering*, 2003; 82(7): 751-765.

Wang Y, Jiao HL, Zhang JZ, He RQ. **Three-dimensional culture of hybridoma cells secreting anti-human chorionic gonadotropin by a new rolling culture system.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004; 1: 35-40.

Wang T, Yang ZQ, Emregul E, David A, Balthasar JP, Liang JF, Yang VC. **Strategies for improving the functionality of an affinity bioreactor.** *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 306(1-2): 132-141.

Warnock JN, Al-Rubeai M. **Bioreactors systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2006; 45: 1-12.

WHO – World Health Organization [*on line*] **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** 2002 [capturado em 01 nov. 2007] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.html>

WHO – World Health Organization [*on line*] **Dengue.** 2008 [capturado em 12 abr. 2008] Disponível em: <http://www.who.int/topics/dengue/en/>

Wohlpert D, Kirwan D, Gainer J. **Effects of cell-density and glucose and glutamine levels on the respiration rates of hybridoma cells.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1990; 36(6): 630-635.

Wurm FM. **Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.** *Nature Biotechnology*, 2004; 22(11): 1393-1398.

Xie LZ, Wang DIC. **Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells.** *Trends in Biotechnology*, 1997; 15(3): 109-113.

Xing Z, Li Z, Chow V, Lee SS. **Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods.** *Biotechnology Progress*, 2008; 24(3): 675-683.

Yamashita M, Katakura Y, Shirahata S. **Recent advances in the generation of human monoclonal antibody.** *Cytotechnology*, 2007; 55: 55–60.