

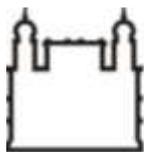
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PBP2a DE
***Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA ATRAVÉS DO**
CULTIVO DE CÉLULAS DE HIBRIDOMAS EM FRASCO DO TIPO
SPINNER

ARTHUR LUIZ CORRÊA

Rio de Janeiro
2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ARTHUR LUIZ CORRÊA

**Obtenção de anticorpos monoclonais anti-PBP2a de *Staphylococcus aureus*
resistentes à meticilina através do cultivo de células de hibridomas em
frasco do tipo *spinner***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Imunobiológicos.

Rio de Janeiro
2013

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

C824 Corrêa, Arthur Luiz

Obtenção de anticorpos monoclonais anti-PBP2 a de
Staphylococcus aureus resistentes à metilina através do cultivo de
células de hibridomas em frasco do tipo spinner / Arthur Luiz Corrêa. –
Rio de Janeiro, 2013.

xx, 79 f. : il. ; 30 cm

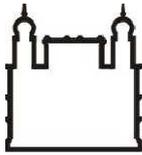
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos,
2013.

Bibliografia: f. 72-78

1. Hibridoma. 2. Frasco spinner. 3. Anticorpo monoclonal. 4.
Staphylococcus aureus resistente à metilina. 5. Planejamento
experimental. I. Título.

CDD 579.353

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologia de Anticorpo Monoclonal (LATAM) e Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), sob orientação do Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa e do Dr. José Procópio Moreno Senna.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ARTHUR LUIZ CORRÊA

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PBP2A DE
Staphylococcus aureus RESISTENTES À METICILINA ATRAVÉS DO
CULTIVO DE CÉLULAS DE HIBRIDOMAS EM FRASCO DO TIPO
*SPINNER***

**Orientadores: Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa
Dr. José Procópio Moreno Senna**

Dissertação aprovada em 12 de abril de 2013

Examinadores:

**Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto
Bio-Manguinhos/Fiocruz /Presidente**

**Dra. Fabiana Regina Xavier Batista
Faculdade de Engenharia Química / Universidade Federal de Uberlândia (UFU)**

**Dra. Ariane Leites Larentis
CESTEH/ENSP/Fiocruz**

**Rio de Janeiro
2013**

Aos meus pais Arthur e Rosângela, e ao meu irmão Felipe pelo constante carinho e apoio. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar sempre presente em minha vida, guiando-me e iluminando meus caminhos;
- A Fiocruz pela oportunidade da realização do mestrado;
- Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos pela infra-estrutura disponibilizada e pelo apoio financeiro fornecido;
- Ao Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunológicos, funcionários e professores;
- À minha família, pelo apoio e paciência;
- Ao Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa e Dr. José Procópio Moreno Senna, pela confiança, atenção, conselhos, incentivo e ensinamentos que possibilitaram que esse trabalho fosse desenvolvido;
- A Dra. Márcia Arissawa pela cooperação;
- Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Anticorpo Monoclonal (LATAM) Alexandre, Fernando, Maira, Marina, Max, Milena, Tiago, Isabela, Melissa e Sheiva que me auxiliaram e incentivaram, em especial a Dra. Márcia Arissawa e Msc. Guilherme Marini pela atenção e ajuda;
- Ao Laboratório de Tecnologia de Recombinante (LATER);
- Ao Dr. Stevens Rehen do Laboratório Nacional de Células Tronco-UFRJ;
- A Dra. Ariane Leites Larentis pela disponibilidade, auxílio, ensinamentos e contribuições;
- Aos amigos da turma MPTI 2011, pela companhia e momentos de descontração, em especial Aline Guimarães, Anna Érika, Cleyton Lage, Dênis Millan e Poliana Vitta, pelo apoio nos momentos de incerteza e à grande amiga Livia Rubatino pela atenção, ombro amigo e conselhos que me ajudaram no decorrer de todo o curso;
- Aos meus amigos Camila Marques, Carolina Catta Preta, Eliza Chazin, Laila, Pedro Batalha e os irmãos do coração Acácio Silva e Lílian Balut pelo carinho sempre dispensado;
- A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, meu muito obrigado.

“..E nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender, sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro”

Albert Einstein

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2. Mecanismo de resistência a β -lactâmicos.....	2
1.3. Mecanismo de resistência das cepas MRSA	3
1.4. Epidemiologia MRSA	4
1.5. Anticorpo Monoclonal: Alternativa de tratamento no combate a cepas MRSA	8
1.6. Anticorpos	9
1.7. Anticorpo monoclonal	11
1.7.1. Tipos de anticorpos monoclonais	12
1.7.2. Tecnologia de hibridomas	12
1.8. Obtenção de anticorpos monoclonais <i>in vivo</i>	14
1.9. Obtenção de anticorpos monoclonais <i>in vitro</i>	15
1.9.1. Cultura de células de mamíferos	15
1.9.2. Sistemas de produção em escala laboratorial	16
1.9.3. Sistemas utilizados no processo de aumento de escala	16
1.9.3.1. Frasco agitado tipo <i>Spinner</i>	17
1.9.4. Sistemas de produção em escala industrial.....	18
1.10. Fatores que influenciam a obtenção de anticorpo monoclonal <i>in vitro</i>	20
1.10.1. Substratos para o cultivo celular.....	21
1.10.2. Acúmulo de metabólitos tóxicos	22
1.10.3. Oxigenação	24
1.10.4. Agitação.....	24
1.10.5. Potencial de Hidrogênio	25
1.10.6. Concentração do inóculo celular inicial	25
1.11. Planejamento Experimental	26
1.12. Justificativa.....	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28

3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Material.....	29
3.1.1. Linhagem celular	29
3.1.2. Meio de cultivo	29
3.1.3. Sistema de cultivo das células de hibridomas - clone 90/DA5/CB5/AA3	29
3.2. Métodos	30
3.2.1. Obtenção da célula de hibridoma clone 90/DA5/CB5/AA3	30
3.2.2. Preservação celular e obtenção do banco de células de trabalho	31
3.2.3. Descongelamento de células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3	31
3.2.4. Manutenção e cultivo das células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3	31
3.2.5. Número de passagens das células de hibridoma, clone 90/DA5/CB5/AA3, e sua influência na obtenção de anticorpo monoclonal anti PBP2a de MRSA	32
3.2.6. Avaliação dos efeitos da concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação sobre o crescimento celular e produção de anticorpo	32
3.2.7. Avaliação da concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo sobre a taxa específica de produção de anticorpo.....	34
3.2.8. Procedimento experimental	37
3.3. Metodologia Analítica	37
3.3.1. Monitoramento do Crescimento e da Viabilidade Celular	37
3.3.2. Determinação da concentração de glicose e lactato nos sobrenadantes de cultivo celular	37
3.3.3. Determinação da concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA em sobrenadantes de cultivo celular-Imuno ensaio Enzimático (ELISA).....	38
3.3.4. Determinação de variáveis cinéticas de crescimento e metabolismo celular	39
4. RESULTADOS	42
4.1. Avaliação do número de passagens das células de hibridoma, clone 90/DA5/CB5/AA3, e sua influência na obtenção de anticorpo monoclonal anti PBP2a de MRSA.....	42
4.2. Avaliação do cultivo de células de hibridoma cultivadas em frasco tipo <i>spinner</i>	43
4.2.1. Cinética celular da condição experimental denominada de ponto central do planejamento fatorial completo 2^2	43
4.2.2. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 1 do planejamento fatorial completo 2^2	44
4.2.3. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 2 do planejamento fatorial completo 2^2	45
4.2.4. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 3 do planejamento fatorial completo 2^2	47
4.2.5. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 4 do planejamento fatorial completo 2^2	48
4.2.6. Determinação de parâmetros cinéticos e bioquímico-metabólicos dos cultivos do planejamento fatorial completo 2^2	49
4.3. Efeitos da concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação sobre o crescimento celular e produção de anticorpo	50

4.4. Efeito da concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo sobre a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA.55	
4.5. Validação dos modelos matemáticos desenvolvidos.....	60
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXOS	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ADCC– Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
- ANOVA – Análise de Variância
- ATP – Adenosina Trifosfato
- Balb/C – Linhagem de camundongo albino
- BHK – Células de rim de camundongo (do inglês *Baby hamster kidney*)
- CA-MRSA –*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina adquirido na Comunidade
- CDC – Citotoxicidade Dependente de Complemento
- CDR – Região Determinante de Complementaridade
- CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório
- C_{mab} – Concentração de Anticorpo Monoclonal
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CO₂ – Gás Carbônico
- CEUA-Comissão de Ética no Uso de Animais
- CHO – Células de ovário de hamster chinês (do inglês *Chinese hamster ovary cell*)
- DCCR – Delineamento do Composto Central Rotacional
- DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco
- DMSO – Dimetilsufóxido
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- F – Distribuição F
- Fab – Fragmento de ligação ao antígeno
- Fc – Fração cristalizável
- Fiocruz– Fundação Oswaldo Cruz
- g – unidade de aceleração da força centrífuga
- G₁ – Intervalo (do inglês *gap*)
- GlcNAc – β-1,4-N-acetilglicosamina
- HAMA – Anticorpo anti-anticorpo humano (do inglês *Human Antimouse Monoclonal Antibodies*)
- HA-MRSA –*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina adquirido no Hospital
- HAT – Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
- HEK –Células embrionárias de rim humano (do inglês *Human Embryonic Kidney*)
- HPRT – Enzima Hipoxantina-Fosforibosil Transferase
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
ICV – Integral de Células Viáveis
Ig – Imunoglobulina
ITS – Insulina:Trasnferrina: Selênio
kDa - Kilodalton
LAEAN – Laboratório de Experimentação Animal
LATAM – Laboratório de Tecnologia de Anticorpo Monoclonal
LATER – Laboratório de Tecnologia Recombinante
µg - Micrograma
Mab – Anticorpo Monoclonal (do inglês *monoclonal antibody*)
mL - Mililitro
MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
MSSA – *Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina
MurNAc –Ácido N-acetilmurâmico
N - Normal
NaCl – Cloreto de Sódio
nm – Nanômetro
OD – Oxigênio Dissolvido
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
PBP – Proteínas de ligação à penicilina (do inglês *Penicillin-binding Proteins*)
PBS –Tampão fosfato de sódio (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)
PBS-T –Tampão fosfato de sódio com Tween 20 (do inglês *Phosphate Buffered Saline-Tween 20*)
p- *p*-valor
pg–Picograma
pH – Potencial hidrogeniônico
PVL – Panton-Valentine Leucocidina
q_{Glic}– Taxa específica de consumo de glicose
q_{Lac}– Taxa específica de formação de lactato
q_{mab}– Taxa específica de produção de anticorpo monoclonal
R² – Coeficiente de determinação
rpm – Rotação por minuto
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*
SCC_{mec} – *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SFB – Soro Fetal Bovino

t – Distribuição t de Student

td – tempo de duplicação

TMB – Tetrametilbenzidina

USAID – *United States Agency for International Development*

UTI– Unidade de Terapia Intensiva

VDTEC – Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico

VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência Intermediária à Vancomicina

VRE – *Enterococcus* Resistente à Vancomicina

VRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Vancomicina

Xv – Concentração de células viáveis

Ysi – Analisador bioquímico *Yellow Spring Instruments*

$Y_{Xv/glic}$ – Coeficiente de rendimento celular em relação ao consumo de glicose

$Y_{mab/glic}$ – Coeficiente de rendimento de anticorpo monoclonal a partir de glicose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero estafilococos.....	1
Figura 1.2:	Representação esquemática da ligação cruzada entre duas cadeias glicanas do peptídeoglicano de <i>S.aureus</i>	2
Figura 1.3:	Estruturas químicas de antibióticos β -lactâmicos Benzilpenicilina e Meticilina.....	3
Figura 1.4:	Representação esquemática das regiões codificadoras <i>mecA-mecR-mecI</i> . As setas indicam o sentido de transcrição dos genes <i>mecA</i> , <i>mecR1</i> e <i>mecI</i>	4
Figura 1.5:	Evolução da resistência de MRSA	6
Figure 1.6:	Prevalência mundial de MRSA	6
Figura 1.7:	Porcentagem de <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina em unidades hospitalares da América Latina.....	8
Figura 1.8:	Estrutura molécula de imunoglobulina	10
Figura 1.9:	Processo de obtenção de anticorpo monoclonal através da tecnologia de hibridomas	14
Figura 1.10:	Frasco tipo <i>Spinner</i> de eixo radial (esquerda) e eixo pendular (direita).....	18
Figura 1.11:	Rotas metabólicas propostas por Shuler e Kargi 1992).....	23
Figura 4.1:	Cultivo celular referente ao ensaio do ponto central do planejamento fatorial completo 2^2 . Concentração celular do inóculo inicial: $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 70rpm. (A) Crescimento celular e concentração de anticorpo monoclonal anti-	

- PBP2a de MRSA. (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato....44
- Figura 4.2: Cultivo celular referente ao ensaio 1 do planejamento fatorial completo 2^2 . Concentração celular do inóculo inicial: $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 40rpm. (A) Crescimento celular e concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA. (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato....45
- Figura 4.3: Cultivo celular referente ao ensaio 2 do planejamento fatorial 2^2 . Concentração celular inicial= $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 100rpm. (A) Crescimento celular e dosagem de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato.47
- Figura 4.4: Cultivo celular referente ao ensaio 3 do planejamento fatorial 2^2 . Concentração celular inicial= $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 40rpm. (A) Crescimento celular e dosagem de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato.....48
- Figura 4.5: Cultivo celular referente ao ensaio 4 do planejamento fatorial 2^2 . Concentração celular inicial= $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 100rpm. (A) Crescimento celular e dosagem de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato.....49
- Figura 4.6: Gráfico superfície resposta para concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) para velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial, obtido a partir do planejamento fatorial completo 2^254
- Figura 4.7: Gráfico superfície resposta para taxa específica de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}) para velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial, para o nível (+1) do tempo de cultivo celular, obtido a partir do planejamento fatorial completo 2^358

Figura 4.8: Crescimento celular e concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA de cinéticas celulares referentes aos ensaios utilizados no processo de validação do modelo matemático. (Ensaio V₁) concentração do inóculo celular inicial de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 28rpm; (Ensaio V₂) concentração do inóculo celular inicial de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 112rpm e (Ensaio V₃) concentração do inóculo celular inicial de $0,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 70rpm.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1:	Classificação de biorreatores segundo homogeneidade do sistema.....	19
Tabela 3.1:	Faixa de valores dos fatores empregados no planejamento fatorial completo 2^2	33
Tabela 3.2:	Plano fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central apresentando os valores das variáveis codificadas e reais, onde, X_1, V_1 =Velocidade de agitação (rpm) codificada e real e X_2, V_2 =Concentração celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL) codificada e real, respectivamente.....	33
Tabela 3.3:	Faixa de valores dos fatores empregados no planejamento fatorial completo 2^3	35
Tabela 3.4:	Plano fatorial completo 2^3 empregado apresentando os valores das variáveis codificadas e reais onde X_1, V_1 = Velocidade de agitação (rpm) codificada e real, X_2, V_2 =Concentração celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL) codificada e real e X_3, V_3 =Tempo de cultivo (dias) codificada e real, respectivamente.....	36
Tabela 4.1:	Concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) ao fim do oitavo dia de cultivo de células de hibridomas cultivado em diferentes passagens em placas de 24 orifícios. Média \pm Desvio padrão ($n=2$).....	42
Tabela 4.2:	Concentração máxima de células viáveis (X_v), taxa específica de crescimento celular (μ_{max}), tempo de duplicação (t_d), concentração máxima de anticorpo (C_{mab}), taxa específica de produção de anticorpo na fase exponencial ($q_{Ac\ exp}$), taxa específica de consumo de glicose (q_{Glic}), taxa específica de formação de lactato (q_{Lac}), coeficiente de rendimento celular em relação ao consumo de glicose ($Y_{Xv/glic}$) e coeficiente de rendimento de anticorpo monoclonal em relação ao consumo de glicose ($Y_{mab/glic}$) das células de hibridomas cultivadas em frasco tipo <i>spinner</i> em meio DMEM completo com 10% de SFB.....	50

Tabela 4.3:	Matriz experimental e resultados da concentração celular (X_v) e concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) obtidos através do planejamento fatorial completo 2^2	51
Tabela 4.4:	Efeitos estimados, erro padrão e p -valor para concentração de anticorpo e concentração celular segundo planejamento fatorial completo para duas variáveis 2^2 para avaliação dos efeitos da concentração celular inicial e velocidade de agitação após o segundo dia de cultivo de hibridoma em frasco tipo <i>spinner</i>	52
Tabela 4.5:	Análise de variância (ANOVA) do planejamento completo 2^2 para concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a.....	53
Tabela 4.6:	Valores experimentais e preditos pelo modelo proposto para concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) segundo planejamento fatorial completo 2^2	55
Tabela 4.7:	Matriz experimental e resultados obtidos através do planejamento fatorial completo 2^3	55
Tabela 4.8:	Efeitos estimados, erro padrão e p -valor para produtividade específica de anticorpo segundo planejamento fatorial completo 2^3 para avaliação dos efeitos da concentração celular inicial e velocidade de agitação e tempo de cultivo de hibridoma em frasco tipo <i>spinner</i>	57
Tabela 4.9:	Análise de variância (ANOVA) do planejamento completo 2^3 para taxa específica de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}).....	59
Tabela 4.10:	Valores experimentais e preditos pelo modelo proposto para taxa específica de produção de anticorpo (q_{mab}) segundo planejamento fatorial completo 2^3	60
Tabela 4.11:	Valores das variáveis codificadas e reais dos ensaios utilizados propostos para realização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde X_1 , V_1 = velocidade de agitação (rpm) codificada e real e X_2 , V_2 =concentração do inóculo celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL) codificada e real, respectivamente.....	61

Tabela 4.12:	Concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) ao fim do segundo dia de cultivo e a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}) dos ensaios realizados no processo de validação.....	63
Tabela 4.13:	Valores experimentais e preditos pelo modelo proposto para concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) ao fim segundo dia de cultivo dos ensaios utilizados no processo de validação do modelo matemático.....	63
Tabela 4.14:	Valores experimentais e preditos pelo modelo proposto para taxa específica de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}) dos ensaios utilizados no processo de validação do modelo matemático.....	64
Tabela 8.1:	Composição química do meio de cultivo DMEM.....	79

RESUMO

Hidridoma é uma linhagem celular produzida em laboratório a partir da fusão de células linfóides produtoras de anticorpo com células cancerígenas não produtoras. São capazes de se proliferar e produzir anticorpos monoclonais específicos de forma contínua. Anticorpos monoclonais são glicoproteínas de alto valor agregado, indicados para uso terapêutico e diagnóstico, e seu uso tem sido proposto para tratamento de infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas, tais como *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), que atualmente são responsáveis por causar 29% das infecções hospitalares no Brasil. O objetivo deste trabalho foi investigar os fatores que podem influenciar na obtenção de anticorpos monoclonais em cultura de células de hibridoma murino anti-PBP2a, em frasco tipo spinner, secretoras de anticorpo monoclonal anti-PBP2a, que confere resistência aos *Staphylococcus aureus*. Os efeitos da variação da concentração do inóculo celular inicial e da velocidade de agitação sobre o crescimento celular e a obtenção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (Mab-PBP2a) foram avaliados através do planejamento fatorial completo 2², enquanto a taxa de produção de anticorpo monoclonal específico foi avaliada por um plano fatorial completo 2³. Foi verificada uma tendência de aumento da concentração de Mab-PBP2a com o uso de maior concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação e uma redução na taxa específica de produção anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi verificada. A velocidade de agitação foi a variável que apresentou maior influência sobre a concentração máxima de células, secreção de Mab-PBP2a e taxa específica de produção de anticorpo monoclonal. Quando as células de hibridoma secretoras do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foram cultivadas em um frasco do tipo *spinner* com eixo fixo agitação e concentração celular inicial de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL a 112rpm, não foi observado efeito negativo sobre a concentração do Mab-PBP2a, ao final do segundo dia de cultivo, sendo obtida uma concentração de 34µg/mL. Foi observado que a concentração do inóculo celular inicial pode ser reduzida, devendo ser considerada a concentração de anticorpo monoclonal secretado e um adequado cultivo celular de hibridomas sem prejuízos na secreção do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA.

ABSTRACT

Hybridoma is a cell line produced in laboratory from the fusion of an antibody-producing lymphocyte and a nonantibody-producing cancer cell. They are able to proliferate and produce a continuous supply of a specific monoclonal antibody. Monoclonal antibodies are glycoproteins with high value-added and are applied in diagnostic and therapeutic, where its use has been proposed to the treatment of multidrug-resistant infections like Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which currently account for 29% of nosocomial infections in Brazil. The aim of this work was to investigate in a spinner flask, the factors that may influence the attainment of monoclonal antibodies in cultured murine hybridoma cells that secrete the monoclonal antibody anti-PBP2a, which confers resistance to *Staphylococcus aureus*. The effects on cell growth and secretion of monoclonal anti-PBP2a of MRSA (Mab-PBP2a) were verified by varying the initial cell inoculum size and agitation speed, and it was assessed using full factorial design 2², while the rate of production of specific monoclonal antibody was evaluated by a full factorial design 2³. It was observed a tendency of increased concentration of Mab-PBP2a when using a higher initial cell inoculum size and agitation speed, while a reduction in the rate specific production of Mab-PBP2a was verified. The stirring speed was the variable factor that had the most important influence on the maximum cell concentration, secretion of Mab-PBP2a and specific rate of production of monoclonal antibody. When MRSA-secreting hybridoma cells were grown in a *spinner* flask type with fixed stirring shaft at a initial cell concentration of $1,3 \times 10^5$ viable cell/mL and 112rpm, no negative effect on the Mab-PBP2a concentration 34 μ g/mL obtained at the end of the second day of cultivation was observed. It was observed that the initial cell inoculum size can be reduced, if considered the concentration of secreted monoclonal antibody and a suitable hybridoma cell culture without reducing the secretion quality of monoclonal anti-MRSA PBP2a.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos encontrados como organismos comensais ou patógenos bacterianos tanto para humanos como para animais. São imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 μm , não formadoras de esporos, podendo aparecer de forma isolada, em pares, em forma de cadeias curtas ou em cachos, conforme mostrado na Figura 1.1 (Zecconi & Hahn 2000).

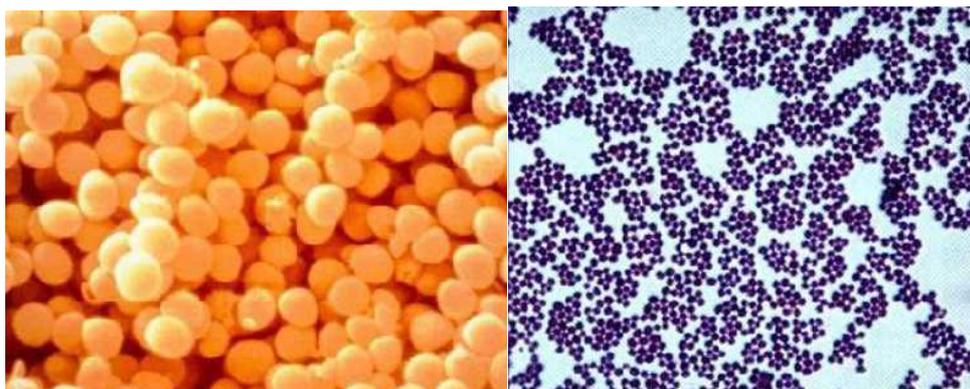


Figura 1.1: Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero estafilococos (Science Photo Library 2012).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) são normalmente encontrados em seres humanos colonizando as superfícies externas da pele e trato respiratório superior, em especial as fossas nasais (Stapleton & Taylor 2002). Aproximadamente 20% das pessoas saudáveis são portadores permanentes de *S. aureus*, 30% são portadores temporários e 50% nunca foram colonizados (Graveland et al. 2011). Esse microrganismo é responsável por causar doenças hospitalares que podem variar desde simples infecções da pele que se manifestam como furúnculos e abscessos ou até mesmo quadros mais severos que podem comprometer a vida (Graveland et al. 2011). As principais infecções causadas por essa bactéria incluem pneumonia, mastite, infecções de pele (impetigo, celulite e furunculoses), osteomielite endocardite e bacteremia. Esse patógeno também pode causar intoxicação alimentar, como resultado da produção enterotoxina (Stapleton & Taylor 2002).

1.2. Mecanismo de resistência a β -lactâmicos

Os estafilococos, assim como as demais bactérias gram-positivas, são envolvidos por uma estrutura polimérica de 20-40nm de espessura, denominada peptídeoglicano, que lhe confere proteção mecânica (Stapleton & Taylor 2002). O peptídeoglicano é formado por pequenos resíduos alternados de ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e ácido beta-1-4-N-acetilglucosamina (GlcNAc). Cada resíduo de ácido N-acetilmurâmico possui uma cadeia peptídica formada pelos aminoácidos L-alanina, D-glutamina, L-lisina e D-alanina que é denominada peptídeo tronco (Stapleton & Taylor 2002).

As cadeias glicanas são ligadas entre si por uma ponte pentaglicina que promove a ligação cruzada entre o resíduo de L-lisina de um peptídeo tronco com um resíduo D-alanina de outro, conforme mostrado na Figura 1.2. Essa ligação cruzada, também conhecida como transpeptidação, ocorre na superfície externa da membrana citoplasmática e é catalisada pelas proteínas ligadora de penicilina (*penicillin-binding-proteins-PBPs*). Além de realizar reações de transpeptidação, as PBPs possuem outro domínio proteico que realiza a extensão da cadeia glicana, reação esta denominada de transglicosilação. O *Staphylococcus aureus* possui quatro tipos de PBP, denominados PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4 (Stapleton & Taylor 2002).

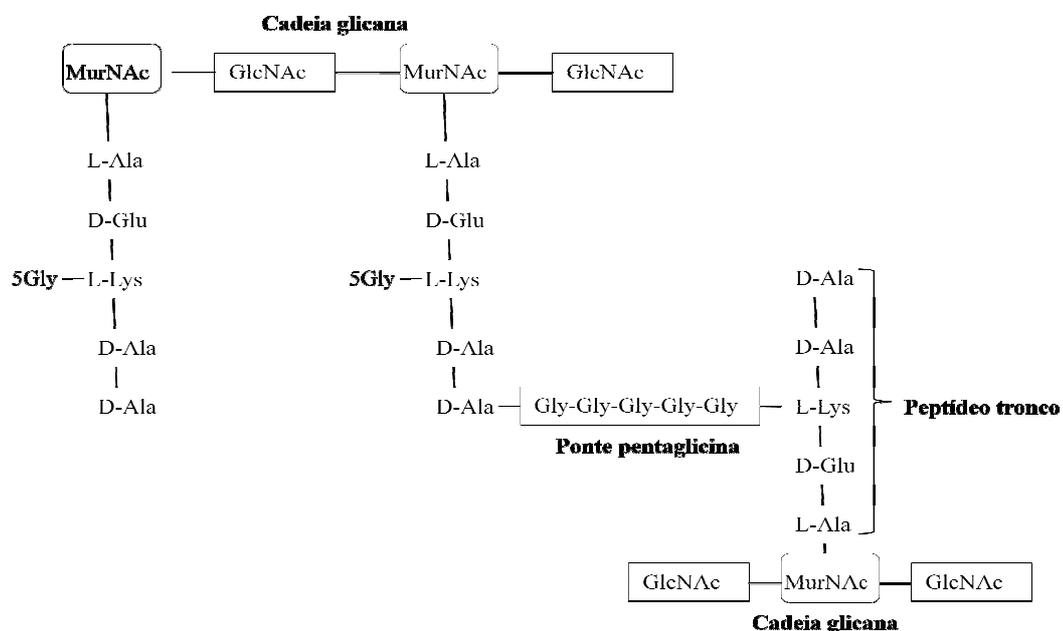


Figura 1.2: Representação esquemática da ligação cruzada entre duas cadeias glicanas do peptídeoglicano de *S. aureus* (Stapleton e Taylor 2002).

Os antibióticos β -lactâmicos, representados pelas Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapênicos e Monobactâmicos, por exemplo, exercem ação antibacteriana através da inibição da síntese da parede celular, uma vez que estes se assemelham ao peptídeo terminal D-alanil-D-alanina do peptídeo tronco e inibem assim o domínio de transpeptidação da PBP. Uma vez inibida a reação cruzada entre as cadeias glicanas, a parede da célula torna-se mecanicamente fraca e susceptível a lise celular (Stapleton & Taylor 2002).

O mecanismo de resistência bacteriano mais frequente é a degradação do antimicrobiano por enzimas. As enzimas β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico, destruindo, assim, o local onde o agente antimicrobiano liga-se às PBPs e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. Essas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extra cromossômico através de plasmídeos ou transposons, podendo ser obtidas de modo constitutivo ou indutível (Bush et al. 1995).

Diante do surgimento de quadro de resistência, diversas tentativas foram feitas para sintetizar novas moléculas resistentes às β -lactamases. Em 1959, foi sintetizada a meticilina, derivada da benzilpenicilina que apresenta dois grupamentos metóxi ligados ao grupamento fenol da benzilpenicilina, conforme mostrado na Figura 1.3. A adição destes substituintes ao grupamento fenol criou um impedimento estérico ao redor da ligação amida, reduzindo assim sua afinidade pela enzima β -lactamase (Stapleton & Taylor 2002). Porém, em 1961, relatos de cepas também resistentes à Meticilina passaram a ser descritos e foram denominadas como *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina–MRSA (Anvisa 2007).

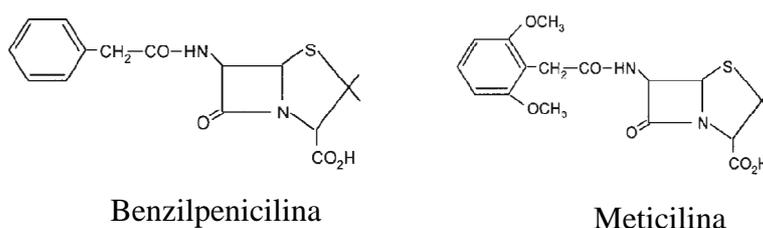


Figura 1.3: Estruturas químicas de antibióticos β -lactâmicos Benzilpenicilina e Meticilina (Stapleton & Taylor 2002).

1.3. Mecanismo de resistência das cepas MRSA

O mecanismo de resistência à Meticilina está relacionado à alteração de proteínas ligadoras de Penicilina (PBP), codificada pelo gene *mecA* e sem relação com a produção de β -lactamases (Stapleton & Taylor 2002).

Staphylococcus aureus Resistentes à Meticilina (MRSA) originaram-se da aquisição de grandes elementos genéticos móveis, denominados de cassete cromossômico estafilocócico

(*Staphylococcal Cassete Chromosome mec* -SCC*mec*) que são carreadores do gene *mecA*, por cepas de *Staphylococcus aureus* Sensíveis à Meticilina (MSSA). O gene *mecA* codifica a síntese de uma proteína ligadora de penicilina adicional denominada PBP2a que possui baixa afinidade pela meticilina e outros β -lactâmicos (Grundmann et al. 2006).

O gene *mecA* é regulado pelos genes *mecI* e *mecRI*, os quais são divergentemente transcritos. Na ausência do antibiótico β -lactâmico, *mecI* reprime a transcrição dos outros dois genes do SCC*mec*. Cinco tipos de SCC*mec* têm sido descritos na literatura, que se diferem no tamanho e composição genética (Jemili-Ben et al. 2006). Já quando os β -lactâmicos estão presentes, a proteína *mecI*, que se encontra localizada na região ativa de *mecA*, é clivada pelo domínio metalo-protease da proteína *mecR1*, permitindo assim a transcrição de *mecA* e subsequente produção de PBP2a (Deurenberg et al. 2006). Uma representação do sistema *mecA*, *mecR*, *mecI*, está mostrada na Figura 1.4.

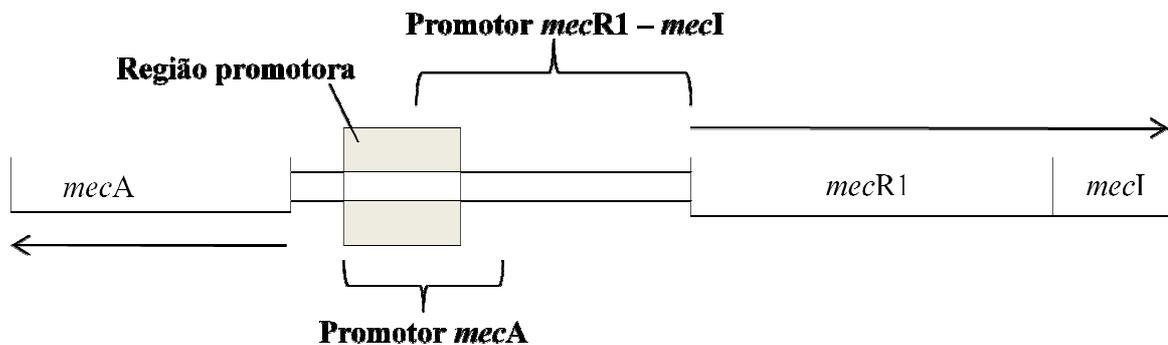


Figura 1.4: Representação esquemática das regiões codificadoras *mecA-mecR-mecI*. As setas indicam o sentido de transcrição dos genes *mecA*, *mecR1* e *mecI* (Stapleton & Taylor 2002).

1.4. Epidemiologia MRSA

Tradicionalmente os MRSA são considerados agentes patogênicos relacionados a infecções hospitalares que foram inicialmente isolados a partir da década de 1960 em hospitais com registro de infecções causadas por agentes bacterianos de elevada resistência à meticilina (Grundmann et al. 2006).

Longa estadia em unidades hospitalares, internações em centros de tratamento intensivo, tratamento de longa duração com antibióticos, intervenções cirúrgicas e contato próximo com indivíduos infectados ou colonizados por MRSA são alguns fatores de risco para a contaminação por MRSA (McCarthy et al. 2010).

Desde meados de 1990, a existência de cepas de MRSA tem sido relatada fora do ambiente hospitalar acometendo indivíduos saudáveis que não apresentam nenhum fator de risco. Esses casos são referidos como MRSA associado à Comunidade (CA-MRSA) e

acredita-se que estas cepas tenham surgido da aquisição de cassetes móveis *SCCmec* por cepas de *Staphylococcus aureus* Sensíveis à Meticilina encontradas fora do ambiente hospitalar. Os CA-MRSA se caracterizam pela rápida velocidade de disseminação, causando infecções principalmente em indivíduos jovens e sadios (Otter & French 2011).

Cepas de MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA) diferem de cepas de MRSA endêmicas de hospitais (HA-MRSA). A distinção entre os termos HA-MRSA e CA-MRSA foi inicialmente realizada através do local de exposição do indivíduo ao agente bacteriano, no entanto, cepas de MRSA são classificadas, atualmente, de acordo com suas características microbiológicas e genéticas (Grundmann et al. 2006).

A maioria das cepas HA-MRSA apresentam os cassetes *SCCmec* tipo I, II ou III enquanto as cepas de CA-MRSA que são mais susceptíveis a outras classes de antibióticos costumam apresentar o *SCCmec* tipo IV ou mais raramente o tipo V, que são cassetes bem menores quando comparados aos outros tipos de *SCCmec* das cepas HA-MRSA. Os CA-MRSA albergam diferentes cassetes cromossômicos de resistência e são mais propensos a codificar o fator de virulência denominado *Panton-Valentine Leucocidina* (PVL), que cria poros na membrana de tecidos infectados. PVL é uma Leucocidina encontrada na maioria das linhagens de CA-MRSA, mas ausente em HA-MRSA, que está relacionada, desde infecções brandas na pele e demais tecidos, até infecções mais severas que podem causar pneumonia e até choque séptico (Otter & French 2011).

Com o surgimento e a disseminação de cepas bacterianas resistentes à Meticilina, as infecções por MRSA começaram a serem tratadas com antibióticos da classe dos glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina. Mas nos últimos anos, surgiram isolados de MRSA com sensibilidade reduzida ou com resistência à vancomicina. Esses isolados foram denominados *S. aureus* Intermediário para Vancomicina (VISA) e *S. aureus* Resistentes à Vancomicina (VRSA), e a classificação é dependente de seu nível de resistência (Mejía et al. 2010).

O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) define *S. aureus* como sendo de reduzida susceptibilidade à vancomicina quando apresentam CIM (Concentração Inibitória Mínima) inferior ou igual a 4µg/mL, como de susceptibilidade intermediária quando apresenta CIM de 4-8µg/mL, e como resistente à vancomicina quando o valor da concentração mínima inibitória é superior a 16µg/mL (Oliveira et al. 2001). Cepas de VISA foram detectadas pela primeira vez em 1996, sendo que em 2002 foi descrita a resistência total do *S. aureus* à vancomicina, conforme mostrado na Figura 1.5

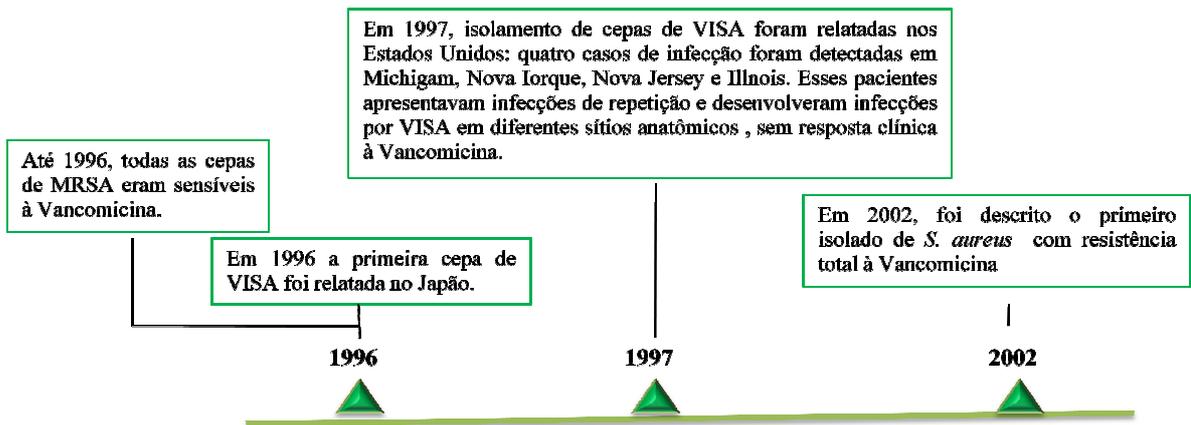


Figura 1.5: Evolução da resistência de MRSA (Anvisa 2007).

O primeiro caso de VRSA- *Staphylococcus aureus* Resistente à Vancomicina foi reportado nos Estados Unidos, em um paciente portador de VRE - Enterococo Resistente à Vancomicina. A presença do gene *vanA*, nessa cepa de VRSA sugere que a resistência pode ter sido adquirida com a troca do material genético do VRE, isolado da mesma amostra (Anvisa 2007). O primeiro relato de isolamento de VRSA da América Latina ocorreu em 2001 no Brasil (Oliveira et al. 2001).

O MRSA, dentre os patógenos resistentes a antibióticos, é um dos mais disseminados no mundo, sendo encontrado em países desenvolvidos da Europa, nas Américas, África, leste Asiático até no Oriente Médio, conforme mostrado na Figura 1.6.

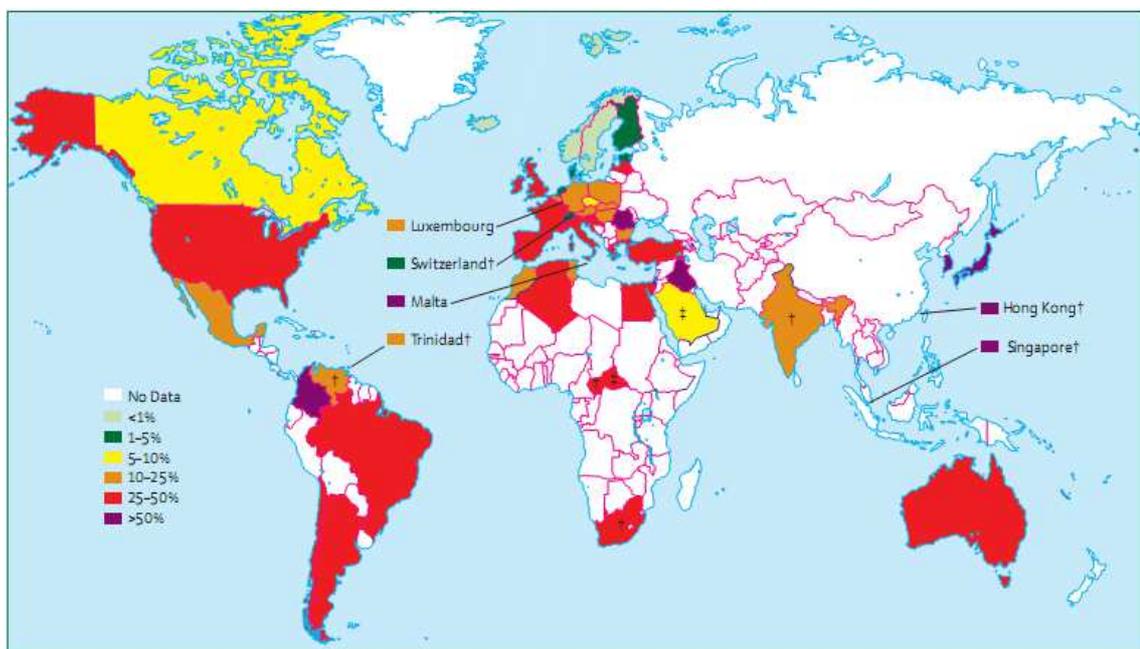


Figura 1.6: Prevalência mundial de MRSA (Grundmann et al. 2006).

Uma vez que infecções por MRSA são, em maior ocorrência, de origem hospitalar e se manifestam como complicação de procedimentos médicos, nem sempre o agente etiológico

da infecção é bem definido. Além de gerar gastos com internação, procedimentos terapêuticos, diagnóstico e medicamentos, as infecções por MRSA podem causar perdas de atividades produtivas e excessiva mortalidade nos indivíduos contaminados (Mejía et al. 2010). Segundo o Centro de Controle de Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (CDC), essas infecções causam cerca de 19.000 óbitos/ano, somente nos Estados Unidos, número este compatível com as mortes provocadas pela AIDS/HIV, hepatite e tuberculose (Boucher & Corey 2007).

Entre os anos de 1999 e 2005 nos Estados Unidos, o número de internações decorrentes de infecções por MRSA praticamente dobrou. Já na Europa, a proporção de infecções hospitalares por MRSA foi de 25-50% no ano de 2009 (Verkaik et al. 2011).

Dados epidemiológicos de MRSA não são muito bem conhecidos em todo o mundo, uma vez que nem todos os países possuem um sistema de vigilância epidemiológica. Na América Latina, por exemplo, até o ano 2000, apenas a Argentina e Venezuela possuíam um sistema próprio de monitoramento de infecções bacterianas. A partir desse mesmo ano, um sistema de monitoramento de doenças bacterianas começou a ser desenvolvido em outros países, inclusive no Brasil, com apoio da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e *United States Agency for International Development (USAID)* (Mejía et al. 2010).

No Brasil, o MRSA também é endêmico de unidades hospitalares; porém, estudos sobre sua colonização são escassos. Um estudo que analisou pacientes no setor de emergência hospitalar identificou que 0,7% dos pacientes no ato da admissão apresentavam-se colonizados por MRSA (Ribeiro et al. 2005). Já em unidades de terapia intensiva (UTI), Korn (2001) relatou que cerca dos 13% de pacientes encontravam-se colonizados enquanto Cavalcanti e colaboradores (2006) observaram que esse número correspondia a 46%. Segundo levantamento da Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços em Saúde (Rede RM), entre os anos de 2006 e 2008, aproximadamente 29% das infecções bacterianas em pacientes de UTI foram provocadas por MRSA (Anvisa 2007).

O número de infecções por MRSA é maior em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), podendo ser responsável por cerca de 50% das infecções bacterianas que ocorrem neste local (Mejía et al. 2010). Em unidades de terapia intensiva do Rio Grande do Sul, por exemplo, 64% das cepas de *Estafilococos* isoladas foram identificadas como sendo de MRSA no ano de 2003; e nos anos de 1993 e 1997 o município do Rio de Janeiro relatou que 93% dos *Estafilococos* isolados eram Resistentes à Meticilina (Mejía et al. 2010).

Em relação a outros países da América Latina, um levantamento realizado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em 2004, mostrou uma prevalência alta de

infecções hospitalares por MRSA na América Latina, como observado na Figura 1.7 (Mejía et al. 2010).

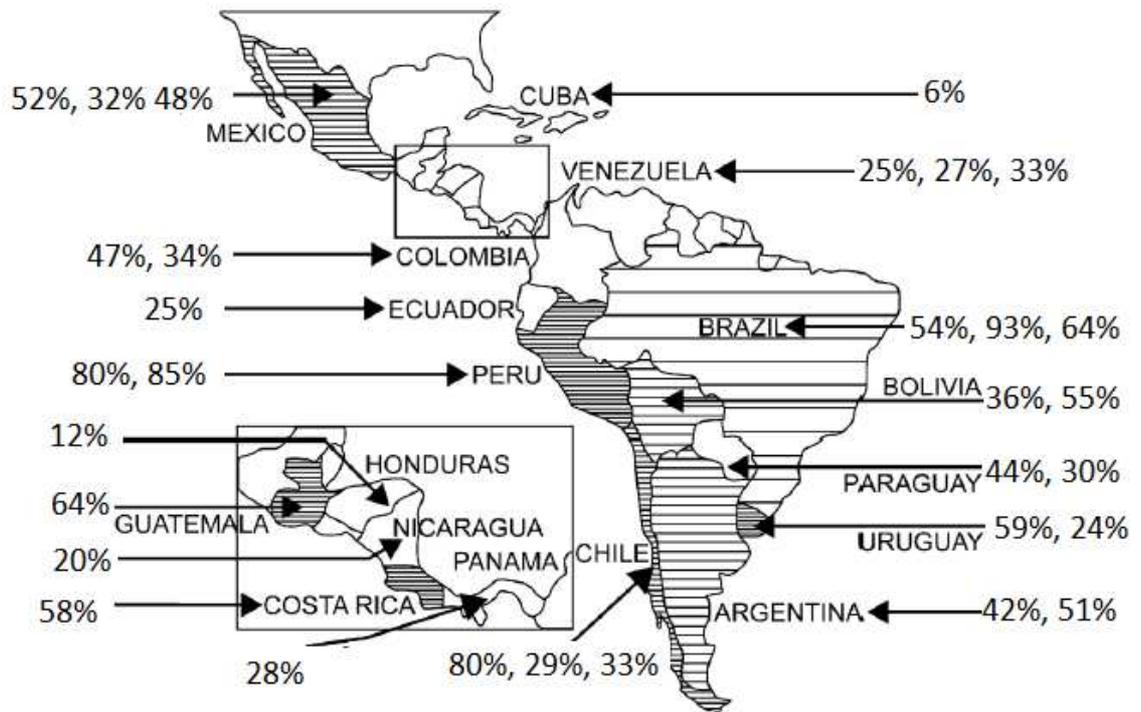


Figura 1.7: Percentagem de *S. aureus* Resistentes à Meticilina em unidades hospitalares da América Latina. Áreas sombreadas indicam >50% a proporção de isolados de MRSA em pelo menos um estudo (Adaptado de Mejía et al. 2010).

1.5. Anticorpo Monoclonal: Alternativa de tratamento no combate a cepas MRSA

Atualmente, uma porcentagem muito pequena da pesquisa global em saúde é dedicada à descoberta de novos medicamentos ou vacinas visando ao controle de infecções bacterianas (Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo 2011).

Apesar do número considerável de antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas, a resistência microbiana, emergência de microrganismos resistentes e a ineficácia de antibióticos em indivíduos imuno comprometidos, podem comprometer a eficácia dessas drogas. A capacidade dos anticorpos em regular ou induzir uma resposta imunológica humoral os torna promissores no combate a infecções bacterianas em indivíduos imunocomprometidos, ou em casos de inexistência de drogas eficazes (Casadevall et al. 2004).

A utilização da imunoterapia passiva, cujos principais representantes são os anticorpos monoclonais, tem sido proposta como alternativa ao uso de antibióticos no combate a cepas multirresistentes e como ferramenta para uso diagnóstico. Os anticorpos monoclonais podem ligar-se diretamente à bactéria atuando como agente opsonizante ou neutralizar toxinas e fatores de virulência. Nenhum anticorpo monoclonal foi ainda aprovado para o tratamento de

doenças infecciosas de origem bacteriana, apesar de diversos candidatos estarem em estudos clínicos e pré-clínicos, sendo que dentre os candidatos, estão três anticorpos monoclonais contra *S. aureus* que não apresentaram eficácia satisfatória comprovada (Fernebro 2011).

Ao administrar uma vacina de DNA em modelo murino contendo uma região interna do domínio transpeptidase da PBP2a no interior de um vetor plasmidial, Senna e colaboradores (2003) observaram que esta proteína era capaz de gerar anticorpos protetores contra MRSA. Diante dessa observação, o anticorpo monoclonal anti-MRSA, que apresenta como alvo a proteína PBP2a, foi desenvolvido em Bio-Manguinhos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC).

1.6. Anticorpos

A primeira evidência experimental do uso de anticorpos foi proposta pelo médico alemão Emil Adolf Von Behring, que demonstrou, juntamente com Shibasaburo Kitasato, a possibilidade da utilização de imunoglobulinas para neutralizar a toxina diftérica, fato este que gerou grande revolução no pensamento científico da época e deu início à soroterapia na Europa. Por este feito, Von Behring recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1901 (Marques 2005).

Paul Ehrlich, médico e bacteriologista alemão agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1908, propôs a teoria da cadeia lateral (*side-chain*), na formação do anticorpo, muito semelhante ao pensamento atual sobre os receptores de superfície. Ehrlich referia-se a essas novas moléculas como balas mágicas (*magic bullets*) devido à capacidade destas encontrarem o antígeno alvo e, por meio de interações específicas, neutralizá-lo e destruí-lo. Alguns autores acreditam que foi a partir da teoria das balas mágicas, desenvolvida por Ehrlich, que o potencial terapêutico dos anticorpos foi desvendado (Benjouad 2009).

Anticorpos são glicoproteínas produzidas por células plasmáticas, em resposta a uma infecção ou inflamação. São capazes de reconhecer e se ligar especificamente a substâncias conhecidas como antígenos. Cada molécula de anticorpo possui uma estrutura única que confere sua especificidade, no entanto, apresentam uma estrutura geral em comum e são conhecidos coletivamente como imunoglobulinas (Janeway et al. 2002). Apresentam duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas entre si por ligações dissulfeto, conforme observado na Figura 1.8.

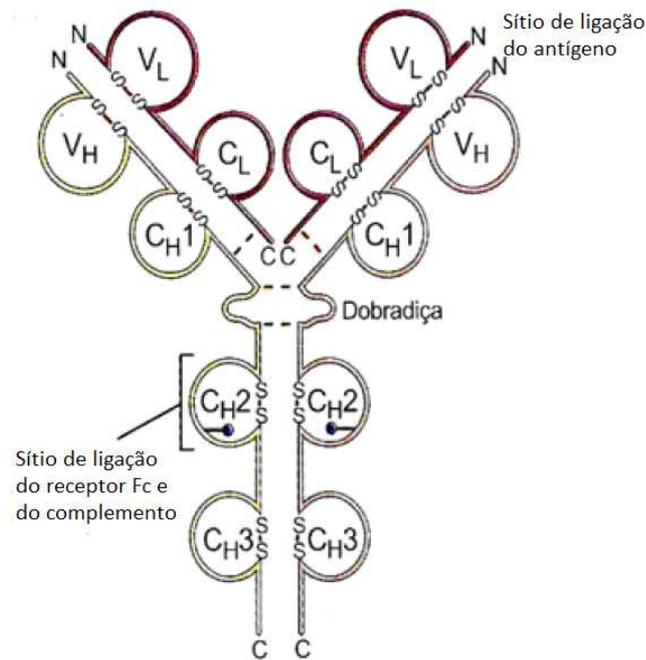


Figura 1.8: Estrutura molécula de imunoglobulina (Adaptado de Abbas et al. 2000).

(S—S) Ponte dissulfeto; (●) Carboidrato; (—) Cadeia pesada;
 (—) Cadeia leve; (○) Domínio Ig.

O peso molecular médio de cada cadeia leve é de aproximadamente 25kDa e de cada cadeia pesada é de 50kDa. A cadeia pesada é formada por 3 regiões constantes e uma região variável, enquanto a cadeia leve compreende uma região constante e uma variável. A especificidade da molécula de anticorpo está relacionada diretamente à sequência de aminoácidos de sítios específicos, denominados regiões determinantes de complementaridade (*Complementarity Determining Regions-CDR*) que são encontrados no domínio variável de suas cadeias pesadas e leves. São estas regiões de hipervariabilidade que interagem e se ligam fortemente com o antígeno alvo (Chartrain & Chu 2008).

De acordo com a sequência primária da região constante da cadeia pesada, as moléculas de imunoglobulina (Ig) podem ser classificadas em IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. As imunoglobulinas da classe IgG, assim como da classe IgE, são secretadas como monômeros e são subdivididas em 4 subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Janeway et al. 2002), que diferem entre si pela sequência de aminoácidos que compõe a região constante da cadeia pesada, responsável pela interação do anticorpo com outras moléculas do sistema imunológico (Chartrain & Chu 2008).

A estrutura da molécula de anticorpos pode sofrer digestão por enzimas proteolíticas gerando os fragmentos Fab e Fc. O fragmento Fab (*Fragment antigen binding*) corresponde ao braço das moléculas que permite a ligação do anticorpo ao antígeno. O fragmento Fc é a fração cristalizável da molécula de anticorpo que determina suas propriedades biológicas

como, por exemplo, tempo de meia vida, interação celular e ativação do sistema complemento (Janeway et al. 2002).

Os anticorpos podem exercer sua ação através de diversos mecanismos que incluem neutralização do alvo antigênico, indução de uma resposta celular citotóxica dependente de anticorpo (*Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity-ADCC*) ou citotoxicidade dependente do complemento (*Complement Dependent Cytotoxicity-CDC*) (Janeway et al. 2002).

1.7. Anticorpo monoclonal

Anticorpos monoclonais (mAbs) são definidos como uma classe de proteínas de elevada especificidade produzida por clones de células híbridas derivadas da fusão de linfócitos B e um mieloma (Köhler & Milstein 1975).

São biofármacos com elevado valor agregado cuja venda de um único produto (Humira[®], comercializado pela Abbott) foi estimada em superar \$9 bilhões/ano (Walsh 2012). Levantamento realizado nos últimos 5 anos mostra que os mAbs correspondem a 1/3 dos biofármacos aprovados para comercialização pelas agências reguladoras americanas e européias (Rodrigues et al. 2010, Walsh 2010, Walsh 2012).

O mercado de biofármacos, em especial os anticorpos monoclonais, tem crescido rapidamente nos últimos anos. No ano de 2009, os mAbs correspondiam a 43% dos biofármacos aprovados enquanto em 2010, a taxa de aprovação subiu para 70%, números estes que indicam um aumento de 62% em um ano (Walsh 2010, Walsh 2012).

Características como a alta especificidade e seletividade os tornam ferramentas ideais para pesquisa básica, diagnóstico e aplicação terapêutica. Na área de pesquisa, são amplamente utilizados em ensaios de imuno localização, *western blot* e imuno afinidade, assim como na rotina diagnóstica para identificação de agentes infecciosos (Chiarella & Fazio 2008). No campo terapêutico, são utilizados para fins profiláticos ou no tratamento de rejeições a transplantes, tratamento de câncer, doenças autoimunes e doenças infecciosas. Já quando conjugados a radioisótopos, quimioterápicos ou toxinas, os anticorpos monoclonais tornam-se importantes veículos de direcionamento da ação de fármacos. Anticorpos monoclonais radiomarcados podem ser utilizados em diagnóstico e terapia (radio-imunodiagnóstico e radio-imunoterapia) (Chakhtoura & Abdelnoor 2010, Mororó 2012). Quando comparados a outros medicamentos apresentam vantagens significativas no que se refere à farmacocinética, toxicidade e geração de efeitos adversos (Reichert et al. 2005).

1.7.1. Tipos de anticorpos monoclonais

Na década de 1980 iniciou-se grande número de estudos clínicos envolvendo anticorpos monoclonais murinos (Reichert et al. 2005). No entanto, a limitação de seu uso em aplicações terapêuticas em humanos foi logo observada em decorrência de sua elevada imunogenicidade, tendo por isso sido restringido sua utilização apenas para aplicações *in vitro* (Benjouad 2009). Anticorpos monoclonais murinos são reconhecidos como antígenos pelo sistema imunológico humano e por isso, desencadeiam uma resposta imune conhecida como HAMA (*Human Antimouse Antibodies*). Esta reação consiste na produção de anticorpos humanos antianticorpo murino que promovem a sua neutralização ou exacerbação da resposta imunológica. Dessa forma, o uso terapêutico de anticorpos monoclonais murinos torna-se limitado, sendo eficaz somente na primeira administração (Reichert et al. 2005, Pucca et al. 2011).

Para superar os problemas de imunogenicidade observada nos anticorpos murinos, no início da década de 80 foram adotadas técnicas de engenharia genética para manipulação dos anticorpos monoclonais que possibilitaram a obtenção de anticorpos quiméricos e humanizados. Os anticorpos quiméricos são resultado da fusão de genes codificadores das cadeias pesadas e leves das regiões variáveis (Fab) dos anticorpos murinos com os genes codificadores da região invariável (Fc) do anticorpo humano. A semelhança de 70% dos anticorpos quiméricos com os anticorpos humanos reduz sua imunogenicidade e consequentemente, melhora sua farmacocinética. No entanto, a afinidade e especificidade dos anticorpos quiméricos tornam-se parcialmente comprometidas (Benjouad 2009).

A fim de reduzir ainda mais a imunogenicidade dos anticorpos quiméricos, as regiões determinantes de complementaridade (CDR) dos anticorpos monoclonais murinos podem ser enxertadas em imunoglobulinas humanas. Os anticorpos humanizados apresentam 90% de semelhança aos anticorpos humanos e possuem maior tempo de meia vida plasmática e são menos imunogênicos. No entanto, foi demonstrado que alguns problemas relacionados à sua especificidade e seletividade podem ainda ocorrer em decorrência de processos mutagênicos dos resíduos de aminoácidos introduzidos na região de reconhecimento do antígeno (Chiarella & Fazio 2008, Benjouad 2009).

1.7.2. Tecnologia de hibridomas

A obtenção de anticorpos foi alterada em 1975 quando Kohler & Milstein (1975) descreveram a técnica de obtenção de anticorpos monoclonais pela tecnologia de hibridomas em que, utilizando como agente indutor de fusão celular o vírus Sendai inativado, obtiveram

células híbridas secretoras de anticorpo monoclonal a partir da fusão de células mielômicas e linfócitos B de camundongos imunizados com hemácias de carneiro.

Em cultivo celular *in vitro*, as células plasmáticas secretoras de anticorpos se mostram incapazes de sobreviver por longo período de tempo. As células mielômicas, linhagem SP2/0 (não secretoras de anticorpo), por exemplo, são células imortalizadas que apresentam alta atividade mitótica. Como resultado da fusão entre estas duas células diferentes são obtidos clones celulares denominados de hibridomas, que possuem como característica a capacidade de crescer em cultura por longos períodos de tempo e secretar anticorpos específicos (Kohler & Milstein 1975, Even et al. 2006).

A técnica para obtenção de hibridomas consiste basicamente na fusão de células mielóides com linfócitos B retirados do baço de camundongos previamente imunizados com o antígeno de interesse, com auxílio do agente fusogênico Polietilenoglicol, conforme mostrado na Figura 1.9 (Even et al. 2006). Após a etapa de fusão realiza-se o isolamento da célula híbrida em meio seletivo HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) e sua seleção pela técnica de diluição limitante (Even et al. 2006).

Durante a fusão celular, três populações de células permanecem em cultivo: linfócitos B, células de mieloma e células híbridas. O isolamento das células híbridas das células de mieloma ocorre no meio de cultivo HAT. As células de mieloma não possuem a enzima Hipoxantina-Fosforibosil Transferase (HPRT), ou seja, são incapazes de utilizar a hipoxantina exógena para biossíntese de nucleotídeos, já a enzima HPRT é encontrada naturalmente nas células híbridas. A aminopterina é um análogo de ácido fólico, presente no meio HAT, que bloqueia a síntese endógena de nucleotídeos das células de mieloma, impedindo assim que estas se multipliquem. Dessa forma, o hibridoma se torna a única célula capaz de sobreviver à etapa de seleção em meio HAT, já que as células de mieloma não se proliferam, e os linfócitos B, por se tratarem de células primárias, não sobrevivem por longo período de tempo em cultivo (Benjouad 2009).

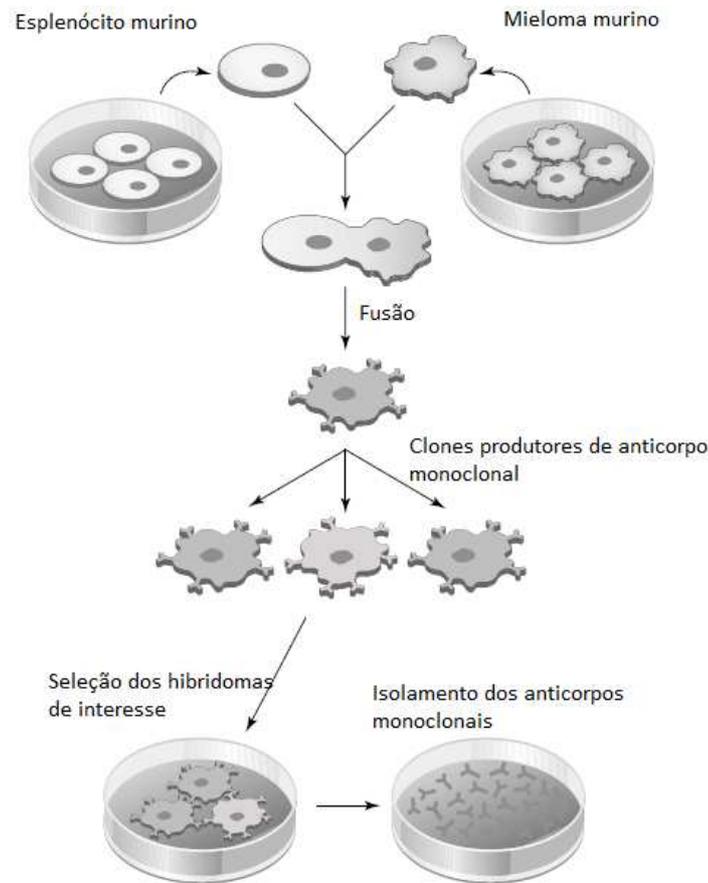


Figura 1.9: Processo de obtenção de anticorpo monoclonal através da tecnologia de hibridomas (Even et al. 2006).

1.8. Obtenção de anticorpos monoclonais *in vivo*

Köhler & Milstein (1975) descrevem duas possibilidades de obtenção de anticorpos monoclonais: obtenção *in vivo* a partir do soro de camundongos e obtenção *in vitro*. A técnica de obtenção *in vivo* passou a ser amplamente adotada quando a utilização do soro de camundongos imunizados como fonte de anticorpo foi substituída por fluído ascítico, também de camundongos (Trebak et al. 1999).

A obtenção *in vivo* de anticorpos monoclonais consiste em duas etapas: (a) imunização do camundongo para geração de clones de linfócitos B que serão fusionados às células de Mieloma do tipo SP2/0, por exemplo, gerando uma célula híbrida denominada hibridoma; (b) indução de ascite em camundongos (Hendriksen & Leeuw 1998).

Para a obtenção de um hibridoma, camundongos BALB/c são normalmente escolhidos para etapa de imunização, já que as células de mieloma utilizadas na posterior etapa de fusão são obtidas também desta linhagem de camundongos. O protocolo de imunização consiste basicamente em uma imunização primária com antígeno conjugado ou não ao adjuvante,

seguido de doses de reforço. Após o período de imunização, os camundongos são submetidos à eutanásia para retirada do baço que será utilizado como fonte de células linfóides secretoras de anticorpos. Após processo de fusão celular, conforme descrito no item 1.7.2, o hibridoma é selecionado de acordo com sua especificidade (Hendriksen & Leeuw 1998).

A geração de ascite é realizada por inoculação intraperitoneal de óleo mineral que promove irritação abdominal com secreção de fluido sanguíneo na região do peritônio, recrutamento de células do sistema imune, maior tempo de exposição das células de hibridomas inoculadas e consequente, obtenção de maiores concentrações de anticorpos monoclonais por fluido ascítico (Hendriksen & Leeuw 1998).

Esta metodologia, apesar de envolver procedimentos simples e fornecer altas concentrações de anticorpos por volume (mL) considerando um lote de camundongos inoculados, apresenta como desvantagens a obtenção de consideráveis concentrações de IgM, (sorologia nos primeiros dias logo após a inoculação), alto custo de obtenção e manutenção de animais de laboratório livres de patógenos específicos em biotérios controlados de criação e de experimentos, presença de anticorpos monoclonais de baixa especificidade decorrentes da contaminação por imunoglobulinas endógenas do camundongo, possibilidade de insucesso no processo de formação de ascite e risco de contaminação por patógenos murinos diversos (Hendriksen & Leeuw 1998).

1.9. Obtenção de anticorpos monoclonais *in vitro*

Ao longo dos anos, melhorias nas técnicas e equipamentos de cultivo celular e o debate sobre a utilização ética de animais de laboratório favoreceram a otimização do cultivo de células animais, como as células de hibridomas, *in vitro* e a tentativa de substituição, senão a diminuição e intenção de término da utilização de animais de laboratório para a obtenção de anticorpos monoclonais.

1.9.1. Cultura de células de mamíferos

O cultivo de células animais tem sido utilizado extensivamente para obtenção de uma grande variedade de produtos proteicos com aplicação diagnóstica, profilática e terapêutica, onde se destacam os anticorpos monoclonais, as vacinas virais e as glicoproteínas humanas recombinantes, respectivamente (Doyle & Griffiths 1999).

Um dos principais propulsores do desenvolvimento do cultivo de células animais foi a procura por vacinas virais, iniciadas durante a Segunda Guerra Mundial. A partir desse período, observou-se um grande desenvolvimento da tecnologia de cultivos celulares para

produção de vacinas virais como, por exemplo, células Vero e HEK-293, produção de proteínas recombinantes em células CHO, BHK, HEK-293 entre outras (Alves et al. 2008). Para obtenção de mAb em sistemas *in vitro*, as linhagens celulares CHO, NS0 e hibridomas murinos e humanizados são as mais utilizadas (Shukla & Thömmes 2010).

Dentre os marcos importantes no desenvolvimento da tecnologia do cultivo celular pode-se citar o desenvolvimento da técnica de conservação de células em nitrogênio líquido na década de 1940 e o desenvolvimento de formulação de nutrientes para o crescimento de células *in vitro* (Butler 1999).

1.9.2. Sistemas de produção em escala laboratorial

Pequenas concentrações de anticorpo podem ser obtidas em cultivo celulares realizados em escala laboratorial (1-100 μ g/mL), utilizando sistemas de cultivo simples e desprovidos de automação como frascos-T, placas de Petri ou placa de múltiplos poços. Pequenas quantidades de anticorpo são suficientes para suprir as necessidades de pesquisas científicas, porém não atendem as necessidades para aplicações diagnósticas e terapêuticas (Rodrigues et al. 2010).

Os sistemas de produção em pequena escala são normalmente simples, baratos e pouco automatizados, o que favorece sua utilização em escala laboratorial, no entanto, são pouco indicados para obtenção de anticorpos em média e grande escala, uma vez que o processo de escalonamento pode tornar-se dispendioso e de difícil realização, além de requerer espaço físico adequado, são desprovidos de um sistema de controle de parâmetros físico-químicos e de agitação capaz de manter a homogeneidade do sistema (Griffiths 2000).

1.9.3. Sistemas utilizados no processo de aumento de escala

O escalonamento do cultivo de células possibilita a obtenção de uma maior concentração de células e produto de forma eficiente e com menor custo. A primeira etapa do processo consiste em utilizar sistemas cujo volume de trabalho seja maior do que os utilizados em frascos de cultivo em escala laboratorial reduzir a quantidade de ensaios e consequentemente o espaço físico utilizado (Doyle & Griffiths 1999).

A grande maioria das técnicas de otimização de processo descritas na literatura tem como objetivo aumentar a longevidade da cultura celular e, por conseguinte, aumentar a produtividade do produto de interesse (Jain & Kumar 2008).

Uma vez que cultivos de células aderentes apresentam a desvantagem de ter seu crescimento limitado pela área superficial do frasco de cultivo, alguns sistemas de pequena e

média escala são utilizados para cultivo de células em suspensão (Rodrigues et al. 2010). O cultivo em suspensão é o método preferido na etapa de escalonamento devido sua simplicidade e baixo custo. Exigem menor espaço físico, possibilitam obtenção de maiores concentrações celulares e permitem o controle de crescimento celular e de parâmetros físico-químicos, quando equipados com sensores específicos (Doyle & Griffiths 1999).

Os sistemas utilizados para cultivo de células aderentes também podem ser empregados para propagação de células em suspensão desde que estes sejam mantidos sobre plataformas agitadoras a fim de evitar a formação de depósitos celulares. No entanto, frascos de cultivo próprios, fabricados com materiais que impeçam a adesão celular e que apresentem formato que favoreça a manutenção de células em suspensão, como os frascos agitados, garrafas rotatórias e frasco tipo *spinner* são mais indicados para obtenção de anticorpos em média escala, escalonamento de bioprocessos e realização de expansão celular (Rodrigues et al. 2010).

A adoção de sistemas agitados, quando comparado a sistemas estáticos utilizados no cultivo de células aderentes, possibilita uma maior transferência de oxigênio em decorrência da existência de uma maior superfície gás/líquido e do emprego de um sistema de agitação que mimetiza as condições encontradas em biorreatores. Porém, sistemas submetidos à oxigenação passiva dificilmente proporcionam a obtenção de elevadas concentrações celulares. Desta forma, uma grande limitação dos sistemas de cultivo empregados no processo de aumento de escala pode ser o fornecimento inadequado de oxigênio e a falta de controle de parâmetros físico-químicos relativos ao cultivo celular (Rodrigues et al. 2010).

1.9.3.1. Frasco agitado tipo *Spinner*

O cultivo de células animais em suspensão quando realizado em escala laboratorial ou em escala piloto objetivando o aumento da produtividade é amplamente realizado em frascos do tipo *spinner*, por apresentarem um sistema de agitação bem semelhante aos encontrados em biorreatores de tanque agitado (Deshpande & Heinzle 2009). Os *spinners* são frascos de cultivos de células fabricados em plástico ou vidro borossilicato, contendo agitador magnético e braços laterais que são utilizados para a adição e remoção de meio de cultivo e células, conforme mostrado na Figura 1.10. Uma vez inoculados com células, os *spinners* são colocados sob placa de agitação magnética e incubados em condições adequadas para o crescimento celular (Jain & Kumar 2008).

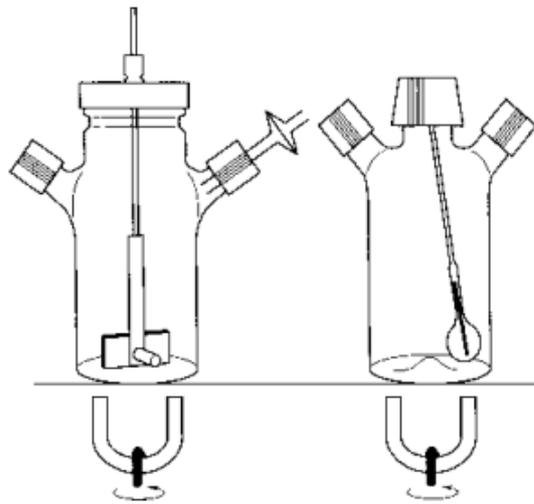


Figura 1.10: Frasco tipo *Spinner* de eixo radial (esquerda) e eixo pendular (direita) (Doyle & Griffiths 2000).

Além de diferentes volumes de trabalho, vários modelos de frasco *spinner* são disponíveis comercialmente, tais como, frascos convencionais com barra magnética agitadora central (frascos com eixo fixo central de agitação) e frascos com sistema pendular de agitação, por exemplo (Griffiths 2000).

Apesar de serem capazes de gerar um ambiente homogêneo de cultivo, a principal limitação encontrada no processo de escalonamento utilizando frascos *spinner* pode ser o baixo fornecimento de oxigênio, uma vez que a baixa velocidade de agitação não favorece uma aeração adequada (Heidemann et al. 1994).

Além de serem utilizadas para cultivo de células em escala laboratorial, realização de expansão celular, obtenção de anticorpos em média escala e como ferramenta de escalonamento de processo, os frascos tipo *spinner* podem ser utilizados para adaptação de células a crescimento em suspensão e na otimização do cultivo de células animais aderidas a microcarregadores (Deshpande & Heinzle 2009, Rodrigues et al. 2010).

1.9.4. Sistemas de produção em escala industrial

Em razão da crescente demanda mundial por imunobiológicos e biofármacos com qualidade, oriundos da biotecnologia do cultivo de células animais, dispositivos mecânicos capazes de oferecer condições ambientais e fisiológicas favoráveis ao cultivo celular, bem como análises bioquímicas e físico-químicas vem sendo utilizados na otimização dos biorreatores celulares. Em relação à produção de anticorpos monoclonais, o uso de biorreatores torna-se de fundamental importância para produzir grandes concentrações de produto e atender a demanda mundial de cerca de 10-100 kg/ano (Jain & Kumar 2008).

Os biorreatores devem assegurar o controle de diversos parâmetros essenciais à proliferação celular como o equilíbrio ácido-base do meio de cultivo, temperatura, fornecimento adequado de gases, suprimento de nutrientes e, quando necessário, suporte para adesão celular, a fim de fornecer condições que favoreçam a proliferação celular e a obtenção do produto de interesse. O desafio fundamental da operação dos biorreatores é garantir a manutenção de um ambiente físico químico homogêneo, evitando a formação de gradientes de concentração (Chico et al. 2008).

Dentre os diferentes tipos de biorreatores disponíveis, a escolha do equipamento a ser utilizado no bioprocessamento deve levar em consideração sua taxa de transferência de oxigênio, homogeneidade do sistema, estresse celular gerado, estabilidade, confiança operacional, escalonamento adequado e custo (Zhong 2010).

1.9.4.1. Biorreatores

Uma das formas de classificar os biorreatores é de acordo com a homogeneidade do sistema, conforme mostrado na Tabela 1.1. São denominados biorreatores heterogêneos aqueles nos quais as células não estão distribuídas de forma homogênea em todo volume de fluido, ou seja, permanecem aderidas a uma superfície ou imobilizadas no interior de um polímero. Por outro lado, os biorreatores nos quais as células encontram-se uniformemente suspensas na fase líquida recebem a denominação de biorreatores homogêneos (Chico et al. 2008).

Tabela 1.1: Classificação de biorreatores segundo homogeneidade do sistema (Chico et al. 2008).

Biorreatores homogêneos	Biorreatores heterogêneos
Biorreator de tanque agitado	Sistemas com microcarregadores
Biorreator <i>air-lift</i>	Biorreatores de leito empacotado
Biorreator de onda	Biorreatores de leito fluidizado
	Biorreator de fibra oca
	Biorreator com crescimento sobre superfícies

Os biorreatores de tanque agitados são os mais utilizados em escala industrial para produção de proteínas recombinantes uma vez que são facilmente escalonáveis e possuem um bom sistema de controle do bioprocessamento e podem ser utilizados para cultivos de células que sejam dependentes ou independentes de ancoramento (Jain & Kumar 2008). Devido à elevada sensibilidade de células animais à agitação, os sistemas de rotor utilizados são constantemente

otimizados, a fim de promover uma transferência de massa adequada sem que, no entanto, ocorra danificação celular significativa. O escalonamento de biorreatores do tipo tanque agitado tem sido bem sucedido até 20.000 litros, por exemplo. Para escalas menores, bem como para a padronização de sistemas de cultivos, frascos *spinners* são indicados (Zhong 2010).

Os biorreatores *air lift*, são muito empregados na produção de anticorpo monoclonal, para fins terapêuticos e diagnósticos. Consiste em um biorreator cujo meio reacional é mantido sob agitação e gaseificado em decorrência da introdução de gases através de sua base. Esses biorreatores promovem baixos níveis de danos celulares uma vez que a homogeneização não é resultado de agitadores mecânicos, mas sim de injeção de uma corrente gasosa (Chico et al. 2008).

Os biorreatores de onda consistem basicamente em uma bolsa plástica estéril parcialmente preenchida com meio de cultivo que são mantidas sobre uma plataforma móvel que controla a agitação e a temperatura do cultivo. O movimento oscilatório da plataforma evita o surgimento de zonas mortas e aumenta significativamente a transferência de oxigênio, sem, no entanto, gerar elevadas tensões de cisalhamento que danifiquem as células (Chico et al. 2008).

Como a maioria das células animais não é capaz de se multiplicar quando cultivadas em suspensão, foi necessário o desenvolvimento de biorreatores heterogêneos que apresentasse uma superfície sólida para adesão celular. São utilizados como suporte para crescimento celular em sistemas agitados micropartículas que podem ser constituídas de diferentes materiais. Em geral, as partículas que permitem crescimento celular na sua superfície são denominadas microcarregadores (Brun-Graeppi et al 2011).

Biorreatores de leito empacotado, leito fluidizado e fibra-oca consistem em sistemas de alta densidade celular que possibilitam a imobilização das células sobre sua superfície (Jain & Kumar 2008).

Outros exemplos de biorreatores heterogêneos são os biorreatores com crescimento sobre superfície como, por exemplo, os sistemas de placas empilhadas e garrafas giratórias que são utilizados para o cultivo de células dependentes de ancoramento (Chico et al. 2008).

1.10. Fatores que influenciam a obtenção de anticorpo monoclonal *in vitro*

Ao estabelecer bioprocessos de cultivos celulares, atenção deve ser dada ao fornecimento adequado de nutrientes para o crescimento celular e minimizar a produção de metabólitos tóxicos. Além dos substratos necessários à proliferação celular, alguns

parâmetros ambientais devem ser considerados, por exercerem influências sobre o crescimento das células e secreção de anticorpos. Dentre os principais fatores, com efeito, sobre o crescimento e produtividade celular, podem ser citados a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (OD), pH, agitação e concentração inicial do inóculo celular (King 2007).

1.10.1. Substratos para o cultivo celular

As células de mamíferos quando cultivadas *in vitro* necessitam de um complexo ambiente nutricional constituído de uma mistura de carboidratos, aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos. Esses constituintes foram identificados como essenciais para a manutenção de células em sistemas *in vitro* e são encontrados nos meios de cultivo basais rotineiramente utilizados. Os meios de cultivo basais mais utilizados para o cultivo de células de hibridomas incluem o Meio Eagle modificado por Dulbeccos (DMEM) e RPMI 1640, por exemplo, utilizados com suplementação de Soro Fetal Bovino (SFB) que possui fatores de crescimento, hormônios e outras proteínas que favorecem o crescimento celular (Even et al. 2006).

Meios de cultivo de células animais devem conter nutrientes essenciais para a síntese de novas células, substratos para o metabolismo celular, além de compostos que desempenhem funções fisiológicas, catalíticas ou que atuem como cofatores (Altamirano et al. 2008).

As células animais, inclusive os hibridomas, quando mantidas em cultivo apresentam padrão metabólico alterado o qual se caracteriza basicamente pelo consumo elevado de fontes de carbono, nitrogênio e energia, o que conduz à geração de metabólitos indesejáveis como o lactato e amônia (Altamirano et al. 2008).

A glicose e a glutamina são as principais fontes de carbono e energia, e são consumidas em grande quantidade para favorecer a rápida proliferação das células de hibridomas, sendo que o consumo completo desses nutrientes do meio de cultivo induz aos processos de apoptose e morte celular (Yeo et al. 2006).

Estudos *in silico* mostraram que 60-85% da glicose consumida por hibridomas é utilizada pela via glicolítica para geração de piruvato e energia, enquanto apenas 6% da glicose é utilizada diretamente para produção de ribose e NADPH pela via da pentose fosfato. A glicose que não é metabolizada para gerar energia é utilizada na biossíntese de amino-açúcares (Acosta et al. 2007).

Durante o início da fase *lag* do crescimento celular, a via glicolítica é o principal produtor de piruvato, cerca de 80% na fase estacionária de crescimento celular quando é

observada redução na concentração de glicose, a via glicolítica gera cerca de 60% do piruvato. Neste mesmo período, observa-se um aumento considerável da produção de piruvato pelo ciclo do ácido tricarboxílico. A maior parte do piruvato (50-80%) é convertida em lactato, enquanto menos de 20% é utilizado na transaminação do glutamato em alanina e menos de 5% é dirigido para o ciclo do ácido tricarboxílico (Selvarasu et al. 2008).

Apesar da conversão da glicose em lactato ser pouco energética, essa é a via de catabolismo da glicose mais comumente utilizada pelas células de hibridoma, uma vez que permite regenerar o NADH mantendo o estado oxidativo da célula (Schneider et al. 1996).

A glutamina é o segundo componente principal dos meios de cultura empregados, sendo o aminoácido encontrado em maior concentração (2 a 5mM) no cultivo de células de mamíferos e a principal fonte de geração de íons amônio. É um importante substrato para síntese proteica, síntese de nucleotídeos e metabolismo energético (Acosta et al. 2007). No que se refere à síntese de anticorpos monoclonais, sua secreção ocorre paralelamente ao consumo de glutamina, podendo ser independente do crescimento celular (Legazpi et al. 2005).

Além das fontes de carbono e nitrogênio, as vitaminas e sais inorgânicos também são essenciais para o crescimento celular. As vitaminas são uma importante matéria prima para a síntese de enzimas e cofatores que catalisam diversas reações metabólicas. Já os sais inorgânicos, além de serem fonte de íons metálicos e fósforo, apresentam fundamental importância na manutenção da osmolaridade do meio (Shibuya et al. 2008).

1.10.2. Acúmulo de metabólitos tóxicos

Dentre os principais fatores que podem limitar o crescimento celular, podem ser citados a exaustão dos nutrientes essenciais e o acúmulo de substâncias tóxicas como o lactato e íon amônio oriundos do metabolismo da glicose e aminoácidos, respectivamente, conforme mostrado na Figura 1.11 (Altamirano et al. 2008).

O lactato é formado a partir da oxidação incompleta de açúcares como a glicose. Este metabólito exerce efeito negativo sobre o crescimento celular e formação do produto de interesse uma vez que sua presença gera acidificação do meio de cultivo e aumento da osmolaridade (Wilkens et al. 2011).

A oxidação incompleta de açúcares, e conseqüentemente a formação de lactato, pode ser reduzida com a utilização de açúcares como a frutose e galactose em substituição a glicose ou através do fornecimento controlado de glicose ao cultivo celular (Mulukutla et al. 2012).

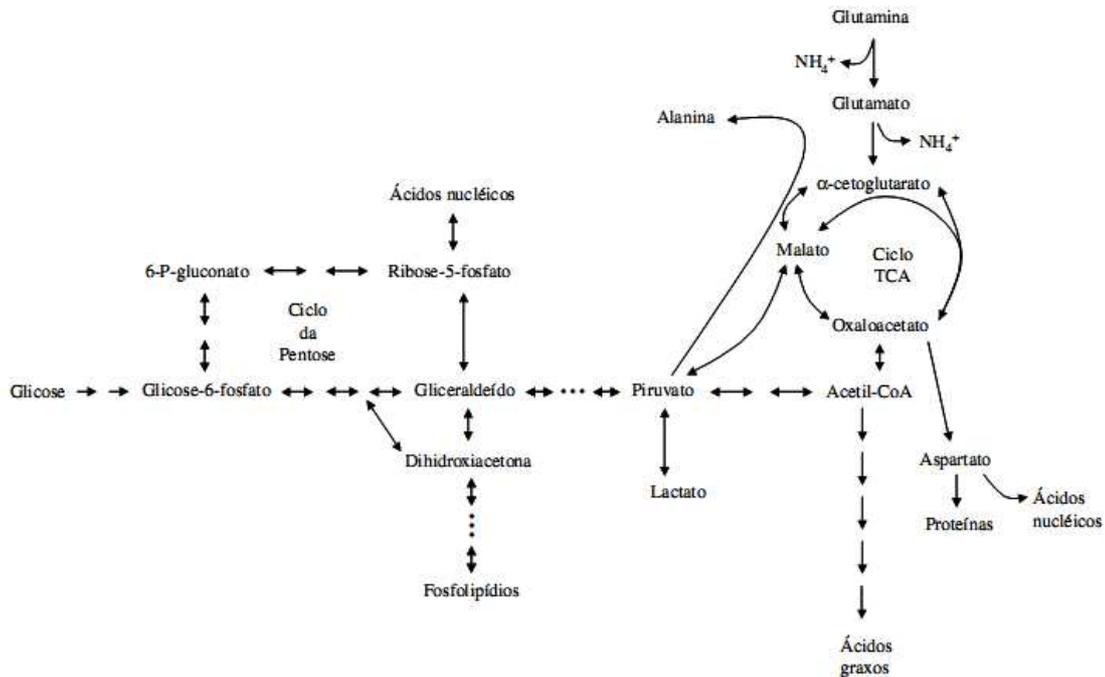


Figura 1.11: Rotas metabólicas de células animais propostas por Shuler e Kargi (1992).

Estudos *in silico* indicam que a menor parte de glutamina (2-5%) disponível no cultivo de hibridomas é utilizada para biossíntese proteica, enquanto que 15-70% da glutamina é convertida em glutamato por ação da enzima glutaminase o qual é em seguida transformado em alfa-cetoglutarato, que pode posteriormente formar amônia ou alanina (Acosta et al. 2007).

Durante uma fase *lag* de adaptação celular, a glutamina é convertida principalmente em alanina (50-70%), enquanto que durante a fase de crescimento celular uma rápida formação de amônia é favorecida. Do ponto de vista energético, a formação de amônia pela via das desidrogenases gera 27 mols de ATP enquanto a formação de alanina pela reação de transaminação gera apenas 9 mols de ATP. Assim sendo, a alta demanda energética necessária durante o rápido crescimento celular, favorece a secreção de amônia (Selvarasu et al. 2008).

Outra forma de geração de amônia ocorre a partir da degradação química no meio de cultivo da glutamina em ácido pirrolidoneocarboxílico e amônia. Esta exerce sua ação tóxica através da redução da taxa de crescimento celular, interferência sobre o processo de glicosilação protéica e aceleração do metabolismo de glicose uma vez que ativa a enzima fosfofrutoquinase (Acosta et al. 2007).

1.10.3. Oxigenação

O oxigênio exerce importante função na reação de fosforilação oxidativa, onde atua como receptor final de elétrons possibilitando a reoxidação das coenzimas transportadoras de elétrons e estocagem de energia, e tem sua disponibilidade reduzida com o aumento da biomassa celular (Acosta et al. 2007). O oxigênio também interfere no metabolismo de nitrogênio, uma vez que baixos teores de oxigenação favorecem a formação de glutamato (Selvarasu et al. 2008).

É recomendável realizar o fornecimento contínuo de oxigênio ao sistema de cultivo uma vez que este gás possui pequena solubilidade em meio aquoso, cerca de 10mg/L (Zhong 2010). No entanto, elevada oxigenação do sistema pode ser prejudicial ao cultivo uma vez que pode danificar a membrana celular através da oxidação de lipídios, alteração de atividades enzimáticas ou dano do material genético celular (Tang et al. 2009). Em média, taxas de oxigênio dissolvido entre 30 e 60% de saturação de ar são consideradas adequadas para o crescimento celular, sendo que concentrações inferiores a 5% e superiores a 80% exercem efeito negativo sobre a concentração celular (Ozturk & Palsson 1990). A produção de anticorpo também é influenciada pela concentração de oxigênio dissolvido, sendo que uma menor concentração de oxigênio (30%) favorece a secreção de anticorpo, enquanto teor mais elevado (50%) favorece o crescimento celular (Ozturk et al. 1991).

Em sistemas de cultivo de células desprovidos de fornecimento mecânico de oxigênio, a oxigenação do cultivo celular ocorre através da difusão passiva do ar para o meio líquido. Em sistemas de cultivo de células submetidos à agitação mecânica, a transferência de oxigênio é dependente da velocidade de agitação e da geometria do *impeller* (agitador) do frasco de cultivo, sendo a transferência de oxigênio favorecida em sistemas de cultivo de pequeno volume inclusive (Desphande & Heinzle 2009).

1.10.4. Agitação

A agitação do sistema de cultivo tem a finalidade de manter as células em suspensão, favorecer o transporte de nutrientes e oxigênio para as células, promover a transferência de calor e de remover o CO₂ de forma mais eficiente quando comparados a sistemas não agitados (Legazpi et al. 2005).

Em sistemas de cultivo agitados, a energia mecânica do *impeller* de agitação é transferida para o líquido e posteriormente dissipado na forma de energia térmica. Essa dissipação de energia pode causar também estresse hidrodinâmico nas células (Godoy et al. 2009).

Um dos efeitos mais severos que este estresse pode causar é a morte celular por necrose, acarretando em ruptura da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares no meio de cultivo (Tanzeglock et al. 2009).

As células animais são sensíveis às forças hidrodinâmicas, uma vez que não possuem parede celular que lhe confira proteção mecânica (Tang et al. 2009). A sensibilidade celular é dependente de vários fatores, tais como, fase de crescimento celular, taxa de crescimento celular, idade da cultura e composição do meio de cultivo. Com o intuito de aumentar a sobrevivência de células em cultivos agitados, diversas substâncias como SFB, albumina, surfactante não iônico (Pluronic F-68[®]) podem ser utilizados (Butler et al. 1999).

1.10.5. Potencial de Hidrogênio

No decorrer do cultivo de células animais é esperado que ocorra uma redução no valor do potencial de hidrogênio (pH) devido à formação de ácido lático. A acidificação excessiva do sistema é prejudicial ao cultivo celular, devendo ser controlado pela utilização de um sistema tampão. O sistema tampão mais comumente utilizado no cultivo de células animais é o tampão bicarbonato que quando na presença de dióxido de carbono, favorece a formação de íons hidroxila evitando uma redução significativo do pH (Griffiths 2000).

O crescimento celular ótimo normalmente é observado em pH 7,2; sendo que o cultivo de hibridomas em condições ácidas pode favorecer a secreção de anticorpos monoclonais enquanto condições básicas aceleram o metabolismo de glicose e glutamina favorecendo a formação de lactato e amônia (Ozturk & Palsson 1991)

Valores de pH também podem interferir na qualidade do produto de interesse favorecendo ou reduzindo a formação de agregados proteicos (Franco et al.1999).

1.10.6. Concentração do inóculo celular inicial

A concentração do inóculo celular inicial do bioprocessamento também deve ser considerada, além da concentração de gases, temperatura e pH (Dutton et al. 1999).

A proliferação de células animais e a manutenção de sua viabilidade são dependentes da existência de fatores de crescimento que podem ser fornecidos pela adição de soro fetal bovino (SFB) ou produzidos pelas próprias células. As células mantidas em cultivo secretam fatores de crescimento autócrinos em pequenas quantidades e por isso necessitam da utilização de uma densidade celular inicial mínima a fim de que a proliferação celular não seja prejudicada (Dutton et al. 1999).

A concentração celular de 2×10^4 células viáveis/mL foi relatada como concentração crítica para o cultivo de hibridomas murinos em frasco *spinner* no ano de 1986 (Ozturk & Palsson 1990). Inóculos celulares na ordem de 10^5 células viáveis/mL estão associados a uma taxa de crescimento celular e secreção de anticorpos consistentes, enquanto concentrações celulares iniciais menores, na ordem de 10^4 células viáveis/mL, culminam com uma extensa fase de adaptação celular (Lee et al. 1991).

Além de influenciar o crescimento celular, a concentração do inóculo celular inicial está relacionada com a concentração máxima celular e em menor proporção com a concentração máxima de anticorpo secretado. Em relação às variáveis cinéticas, há divergência entre os autores no que se refere a uma relação entre concentração do inóculo celular inicial e taxa específica de crescimento (Voigt & Zintl 1999).

1.11. Planejamento Experimental

O método tradicional de experimentação é uma forma de estudar um sistema e consiste na variação de um único fator a cada experimento em que uma análise empírica pode exigir a realização de um grande número de experimentos. Isso ocorre porque uma análise univariável não fornece informação a respeito de interações existentes entre diferentes fatores significativos (Montgomery 1991; Rodrigues & Iemma 2009).

O planejamento estatístico de experimentos é uma ferramenta que permite a realização de uma análise multivariável que por sua vez consiste em uma abordagem com fundamento matemático que permite estudar todos os fatores de interesse simultaneamente e, obter as informações desejadas a partir da realização de um menor número de experimentos (Nikel et al. 2005, Didier et al. 2007).

A metodologia de planejamento fatorial foi introduzida por Box na década de 1950, mas tem sido aplicada mais intensamente somente nos últimos anos devido à facilidade do uso de programas computacionais que realizam análises estatísticas (Rodrigues & Iemma 2009).

O planejamento experimental consiste na avaliação simultânea de diferentes variáveis para que o efeito da interação que possa haver entre elas não seja desprezado. Em um planejamento fatorial completo é necessária a realização de experimentos de modo que todas as possíveis combinações dos valores extremos das faixas escolhidas para cada parâmetro de estudo, denominada de variável, sejam analisadas. Neste planejamento, o número de experimentos é determinado por 2^n , onde “n” é o número de variáveis avaliadas. Quando o número de variáveis é muito grande, realiza-se previamente uma triagem das variáveis através

da execução de um ou mais planejamento fatorial fracionário. Neste tipo de planejamento, verificam-se quais variáveis não são estatisticamente significativas e a partir destas informações realiza-se o planejamento fatorial completo subsequente. Os modelos matemáticos obtidos, que correlacionam as variáveis independentes com as variáveis-resposta, são propostos com base em uma análise de variância e permitem a determinação das faixas ótimas de operação (Rodrigues & Iemma 2009).

Quando o modelo é validado e considerado adequado para a descrição do processo, ele pode ser utilizado para prever condições diferentes daquelas empregadas no plano fatorial e que atendam à sua necessidade, devendo ser as respostas comprovadas experimentalmente nas condições previstas pelo modelo. Revelando desta forma a potencialidade do emprego destas técnicas estatísticas que, permitem atingir com o menor número de experimentos as condições ótimas de um processo, quando comparado com a avaliação que emprega métodos que analisam uma variável por vez (Rodrigues & Iemma 2009, Marini 2011, Larentis et al. 2012). Por outro lado, uma das limitações da técnica é que a predição de respostas só é realmente confiável do ponto de vista estatístico nas faixas estudadas no plano experimental, neste caso, entre (+1) e (-1), podendo somente indicar tendências nas condições fora destas faixas.

1.12. Justificativa

Os *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) apresentam amplo espectro de resistência a diversos antibióticos o que promove graves dificuldades em assegurar um tratamento adequado e eficaz. Alternativas ao uso de antibióticos têm sido propostas, entre elas, a adoção da imunoterapia passiva, neste caso, tendo como alvo a PBP2a que é uma enzima transpeptidase específica de MRSA presente na superfície da bactéria.

Conhecer o comportamento dos cultivos de células de hibridomas e os padrões de secreção do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA em sistemas de cultivos em frascos *Spinners* tornam-se etapas importantes da caracterização da linhagem celular, do anticorpo monoclonal secretado e do modo de obtenção *in vitro* com possibilidade de aplicação no desenvolvimento de bioprocessos em biorreatores para produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA visando atender a atual e crescente demanda pelo anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, gerar conhecimento técnico-científico em Tecnologia de Imunobiológicos e Biofármacos e mão de obra especializada com aplicação futura em plantas produtivas de grande escala de kits diagnósticos e reagentes em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a influência da velocidade de agitação e da concentração do inóculo celular inicial sobre a obtenção de anticorpos monoclonais em cultivos de células de hibridomas em suspensão, secretoras de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, em frasco tipo *spinner*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Estudar o comportamento cinético dos cultivos celulares de células de hibridomas em suspensão, clone 90DA5/CB5/AA3 secretoras de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, utilizando frascos do tipo *spinner*;
- 2) Avaliar o comportamento do metabolismo bioquímico das células de hibridoma, clone 90DA5/CB5/AA3, secretoras de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, em relação ao consumo de glicose e formação de lactato;
- 3) Determinar a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA secretado nos cultivos realizados.
- 4) Analisar a influência da velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial no padrão de secreção do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos em Bio-Manguinhos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), no Laboratório de Tecnologia de Anticorpo Monoclonal (LATAM) e Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER).

3.1. Materiais

3.1.1. Linhagem celular

Células de hibridoma murino, clone 90/DA5/CB5/AA3, secretora de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA), pertencente ao banco de células do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM)-Bio-Manguinhos -Fiocruz foram utilizadas para a realização deste trabalho.

3.1.2. Meio de cultivo

Foi utilizado meio basal DMEM (Invitrogen), conforme composição básica mostrada no Anexo 1; suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Sigma[®]), 3mM de Glutamina (Merck[®]), ITS: 5mg/L de Insulina, 5mg/L de Transferrina e 5µg/L de Selênio (Sigma[®]), 15mM de tampão Hepes (Sigma[®]), 3,7g/L de Bicarbonato de Sódio (Merck), 0,003% (v/v) de β-Mercaptoetanol (Sigma[®]) e 1% (v/v) de solução de antibiótico: Penicilina – 10000 U, Estreptomicina – 10 mg e Anfotericina – 25 µg (Sigma[®]).

3.1.3. Sistema de cultivo das células de hibridomas - clone 90/DA5/CB5/AA3

As células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3, foram cultivadas e propagadas em frascos com tampa ventilada estéreis para cultivo de células de poliestireno do tipo T25 cm² e T75 cm² (Corning[®]). Para a realização os experimentos, as células foram retiradas dos frascos de sistema de cultivo estático do tipo T75cm², ressuspendidas e inoculadas em frascos estéreis

do tipo *spinner* em vidro borossilicato com eixo fixo de agitação com capacidade de 500 mL e volume de trabalho de 200mL (Bellco®). Os *spinners* foram mantidos sob placas agitadoras magnéticas em estufas a 37°C e atmosfera de 5% CO₂.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção da célula de hibridoma clone 90/DA5/CB5/AA3

A célula de hibridoma, clone 90/DA5/CB5/AA3, secretora de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, foi obtida de acordo com a técnica descrita por Kohler e Milstein (1975). Camundongos Balb/C, fêmeas, de 4 a 8 semanas, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) em Bio-Manguinhos, para os ensaios de imunização e proteção *in vivo*, foram inoculados por via intraperitoneal com uma dose inicial de plasmídeo pCl-Neo contendo o fragmento do gene *mecA* de MRSA (Senna et al. 2003). Após 14 dias, os camundongos foram inoculados via intraperitoneal com uma 2ª dose contendo 10µg de proteína recombinante purificada, correspondente a uma região interna da PBP2a emulsificada em adjuvante de Freund incompleto, conforme descrito por Roth et al. 2006. Quatorze dias após a segunda inoculação, o camundongo que apresentou melhor resposta imune, avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA), recebeu uma 3ª inoculação via intravenosa de 10µg de proteína purificada diluída em tampão fosfato de sódio (PBS). Três dias após a inoculação via intravenosa, o animal foi submetido à eutanásia ética conforme protocolo CEUA nº L0009-07-Fiocruz, sendo o baço retirado assepticamente para obtenção dos linfócitos utilizados na fusão celular.

Os linfócitos foram então submetidos à fusão com células de Mieloma SP2/0, empregando polietilenoglicol como agente fusionante. Após a fusão, as células foram cultivadas em meio Hipoxantina Aminopterina Timidina (HAT), em estufa a 37°C e atmosfera de 10% de CO₂ conforme protocolo para produção de anticorpos monoclonais em *Current Protocols in Immunology* (Yokoyama 1995). As células de hibridomas obtidas foram avaliadas 14 dias após a fusão celular por ELISA, empregando a proteína recombinante purificada como antígeno. Os hibridomas que mostraram resultados satisfatórios foram submetidos à clonagem, seguida da seleção dos melhores clones secretores. Os clones obtidos, como o 90/DA5/CB5/AA3 foram congelados e armazenados em de nitrogênio líquido a -196°C.

A célula de hibridoma, clone 90/DA5/CB5/AA3, secretora do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, conforme descrito foi desenvolvido em Bio-Manguinhos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), vinculado ao Programa de Biofármacos e atualmente é protegido pelo pedido de patente nº WO/2011/017791, que reivindica sua aplicação em estudos de imunoterapia e imunodiagnóstico.

3.2.2. Preservação celular e obtenção do banco de células de trabalho

As células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3, foram preservadas em criotubos mantidos em nitrogênio líquido a -196°C . Para o congelamento, as células em fase exponencial de crescimento celular foram centrifugadas a $180\times g$ por 5 minutos e após descarte do sobrenadante foram ressuspensas em meio de congelamento mantido a 4°C e constituído de 39% (v/v) do meio DMEM completo (meio DMEM suplementado com 10% (v/v) SFB), 50% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma[®]). A suspensão celular na concentração de 1×10^7 células viáveis/mL foi então distribuída em criotubos (Nunc[®]) de 1mL e mantidos por 24h em freezer à -70°C , após este período, os criotubos foram transferidos definitivamente para tanque de nitrogênio líquido a -196°C , estabelecendo-se assim um banco de trabalho.

3.2.3. Descongelamento de células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3

Para a realização dos experimentos, os criotubos pertencentes ao banco de trabalho foram descongelados sempre que necessário. O criotubo foi retirado do tanque de nitrogênio líquido e, após rápido descongelamento em banho de água a 37°C de temperatura, seu conteúdo foi transferido para tubo cônico estéril contendo 10mL de meio de cultivo DMEM completo a 37°C de temperatura e submetido à centrifugação a $180\times g$ por 5 minutos. O meio de cultura foi então descartado para remoção do DMSO e as células ressuspensas em 5mL de meio DMEM completo e transferida para frasco de cultivo T25cm² que foram mantidas em estufa em temperatura de 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.2.4. Manutenção e cultivo das células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em frascos de cultivo dos tipos T25cm² e T75cm² e mantidos em estufa à 37°C e atmosfera úmida de 5% de CO₂. As trocas de meio de cultura foram realizadas a cada dois dias a fim de manter o fornecimento

adequado de nutrientes e controle de pH, e os subcultivos realizados sempre que a confluência celular era atingida, através do desprendimento das células da superfície do frasco de cultivo por ação mecânica.

Uma vez obtida quantidade celular suficiente para realização dos experimentos, as células foram homogeneizadas e colocadas em tubos estéreis de centrífuga de 50 mL, submetidas a centrifugação a 180xg por 5 minutos, e ressuspensas em meio DMEM com 10% (v/v) de SFB.

3.2.5. Número de passagens das células de hibridoma, clone 90/DA5/CB5/AA3, e sua influência na obtenção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA

Os cultivos de células de hibridomas, utilizados para verificar a secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA ao decorrer dos subcultivos, foram realizados em duplicata em placas de poliestireno de 24 orifícios (Falcon[®]), com volume de trabalho de 1mL, utilizando o meio de cultivo DMEM com 10% (v/v) SFB. Após realizar subcultivos a cada três dias em frasco T75cm², as células de hibridomas nas passagens 10, 15, 20, 30, 40 e 50 foram inoculadas em placa de poliestireno com concentração celular de $0,5 \times 10^5$ células viáveis/mL e incubadas em estufa em temperatura de 37°C e 5% de CO₂ por 8 dias.

3.2.6. Avaliação dos efeitos da concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação sobre o crescimento celular e produção de anticorpo

Os efeitos da variação da concentração do inóculo celular inicial e da velocidade de agitação sobre o crescimento celular e a produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foram avaliados através de um planejamento fatorial completo de duas variáveis (2²) com triplicata do ponto central. Para a velocidade de agitação, os níveis inferiores (-1) e superiores (+1) relativos aos parâmetros experimentais foram de 40 e 100rpm, respectivamente, com ponto central (0) de 70rpm. A concentração do inóculo celular inicial empregada variou de $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL no nível inferior (-1) a $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL no nível superior (+1), com ponto central (0) de $1,4 \times 10^5$ células viáveis/mL.

As variáveis independentes (concentração inóculo celular inicial e velocidade de agitação) analisadas e suas faixas de trabalho são mostradas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Faixa de valores dos fatores empregados no planejamento fatorial completo 2^2 .

Fatores	Níveis		
	Inferior	Superior	Ponto central
	(-1)	(+1)	(0)
Velocidade de agitação (rpm)	40	100	70
Concentração do inóculo celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL)	0,6	2,2	1,4

Os ensaios relativos à condição do ponto central foram realizados de forma a determinar o erro experimental e avaliar a linearidade dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas do bioprocesso, sendo sua triplicata utilizada para calcular as médias e desvio padrão das respostas avaliadas.

Para a construção do plano fatorial completo de duas variáveis apresentado na Tabela 3.2, os valores normalizados (+1) e (-1) foram intercalados em duas colunas de forma que todas as combinações experimentais possíveis fossem obtidas e adicionadas repetições do valor zero, relativo à condição do ponto central (0), que corresponde ao valor intermediário entre os níveis superior e inferior. Através da utilização de variáveis normalizadas, seus efeitos podem ser comparados sem que sofram influência da amplitude dos valores reais correspondentes ao nível superior e inferior, permitindo, desta forma, identificar aqueles com maior influência sobre as respostas avaliadas do bioprocesso (Larentis et al. 2012).

Tabela 3.2: Plano fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central apresentando os valores das variáveis codificadas e reais, onde, X_1, V_1 =Velocidade de agitação (rpm) codificada e real e X_2, V_2 =Concentração celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL) codificada e real, respectivamente.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X_1	X_2	V_1	V_2
	Velocidade agitação	Concentração inóculo celular inicial	Velocidade agitação (rpm)	Concentração inóculo celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL)
1	-1	-1	40	0,6
2	1	-1	100	0,6
3	-1	1	40	2,2
4	1	1	100	2,2
5	0	0	70	1,3
6	0	0	70	1,3
7	0	0	70	1,3

As avaliações de significância estatística foram realizadas empregando o teste “*t* de Student” (distribuição de Student) a qual avalia a probabilidade de que as variáveis analisadas apresentem efeito sobre a resposta de interesse. Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos envolvendo cultivo de células, foi utilizado o intervalo de confiança de 90% para reduzir a probabilidade de que fatores relevantes fossem considerados não significativos (Rodrigues & Iemma 2009, Marini 2011).

Os dados experimentais foram processados empregando-se o programa Statistica 6.1 e os modelos propostos validados primeiramente pela Análise de Variância (ANOVA). A qualidade do ajuste do modelo foi verificada pelo coeficiente de determinação (R^2) calculado pela razão entre variação explicada pelo modelo e variação total, enquanto que a distribuição “F” foi utilizada para se verificar a significância do modelo, a qual é comprovada quando o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior que F_{tabelado} . O modelo também foi validado pela comparação dos dados experimentais e dados preditos, sendo sua capacidade preditiva confirmada quando baixos erros relativos forem encontrados (Rodrigues & Iemma 2009, Larentis et al. 2012).

3.2.7. Avaliação da concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo sobre a taxa específica de produção de anticorpo

O efeito da concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo sobre a taxa específica de produção de anticorpo foi avaliada através de um planejamento fatorial completo para três variáveis (2^3) com triplicata do ponto central em cada um dos dias de cultivo. Os parâmetros experimentais para a concentração celular inicial e velocidade de agitação foram os mesmos empregados no planejamento fatorial 2^2 apresentados no item 3.2.5, ou seja, concentração do inóculo celular inicial variando entre 0,6 e $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação variando entre 40 e 100rpm e condição utilizada no ponto central de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e 70rpm. Os cultivos foram avaliados ao final do primeiro e segundo dias de cultivo, que correspondem ao nível inferior (-1) e nível superior (+1) empregado para a variável tempo, respectivamente. O ponto central das variáveis, concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação, foram obtidos através da média dos valores referentes ao nível superior (+1) e inferior (-1) a fim de determinar os erros experimentais relacionados ao processo através do ponto central. Diferentemente das demais variáveis (concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação), o tempo de cultivo neste planejamento foi usado como variável de tipo, uma vez que o tempo intermediário não teria significado prático em termos de processo. Neste caso, o ponto central deve ser avaliado nas condições intermediárias das variáveis, concentração do

inóculo celular inicial e velocidade de agitação em cada um dos dias de cultivo, cada um em triplicata, totalizando seis pontos centrais, conforme mostrado nas Tabelas 3.3 e 3.4.

Os parâmetros avaliados foram analisados nos níveis superior (+1), inferior (-1) e ponto central (0) conforme mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Faixa de valores dos fatores empregados no planejamento fatorial completo 2^3 .

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Superior (+1)	Ponto central (0)
Velocidade de agitação (rpm)	40	100	70
Concentração do inóculo celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL)	0,6	2,2	1,4
Tempo de cultivo celular (dia)	1	2	1 e 2

A construção do planejamento fatorial apresentado na Tabela 3.4 foi realizada em três etapas. As sete primeiras linhas foram preenchidas de forma intercalada com os valores (+1) e (-1) em duas colunas de forma que todas as combinações experimentais possíveis fossem obtidas e em seguida adicionado três repetições do valor 0 (zero), referentes ao ensaio do ponto central. Em seguida, os mesmos valores adicionados nas primeiras linhas da tabela foram repetidos nas sete últimas linhas da tabela. Finalmente, a terceira coluna foi completada com uma repetição de sete valores (-1), seguido da repetição de sete valores (+1).

Observa-se na Tabela 3,4 que a amplitude dos valores reais entre o nível inferior (-1), central (0) e superior (+1) da variável concentração do inóculo celular inicial não mantiveram o princípio da ortogonalidade. No entanto, ao considerar o erro experimental envolvido na determinação da concentração do inóculo celular inicial, verifica-se que a diferença entre o valor real ($1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL) e o valor proposto ($1,4 \times 10^5$ células viáveis/mL) não foi significativo, indicando assim que a estimativa dos efeitos da variável analisada não foi comprometida.

Dos quatorze ensaios propostos pelo planejamento fatorial completo para três variáveis (2^3), os ensaios de 1 a 7, correspondem às combinações das variáveis velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial assim como a triplicatas do seu ponto central para os cultivos mantidos por um dia, enquanto os ensaios de 8 a 14 se referem às mesmas combinações das variáveis velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial e triplicatas do ponto central para os cultivos mantidos até o segundo dia.

Tabela 3.4: Plano fatorial completo 2^3 empregado, apresentando os valores das variáveis codificadas e reais onde X_1, V_1 = Velocidade de agitação (rpm) codificada e real, X_2, V_2 =Concentração celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL) codificada e real e X_3, V_3 =Tempo de cultivo (dias) codificada e real, respectivamente.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X_1	X_2	X_3	V_1	V_2	V_3
	Velocidade de agitação	Concentração inóculo celular inicial	Tempo de cultivo	Velocidade de agitação (rpm)	Concentração inóculo celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL)	Tempo de cultivo (dias)
1	-1	-1	-1	40	0,6	1
2	1	-1	-1	100	0,6	1
3	-1	1	-1	40	2,2	1
4	1	1	-1	100	2,2	1
5	0	0	-1	70	1,3	1
6	0	0	-1	70	1,3	1
7	0	0	-1	70	1,3	1
8	-1	-1	1	40	0,6	2
9	1	-1	1	100	0,6	2
10	-1	1	1	40	2,2	2
11	1	1	1	100	2,2	2
12	0	0	1	70	1,3	2
13	0	0	1	70	1,3	2
14	0	0	1	70	1,3	2

Os dados experimentais foram processados empregando-se o programa Statistica versão 6.1 e os modelos propostos validados primeiramente pela Análise de Variância (ANOVA). A qualidade do ajuste do modelo foi verificada pelo coeficiente de determinação (R^2) calculado pela razão entre variação explicada pelo modelo e variação total, enquanto que a distribuição “F” foi utilizada para se verificar a significância do modelo, a qual é comprovada quando o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior que F_{tabelado} . O modelo também foi validado pela comparação dos dados experimentais e dados preditos, sendo sua capacidade preditiva confirmada quando baixos erros relativos foram encontrados (Rodrigues & Iemma 2009, Larentis et al. 2012).

3.2.8. Procedimento experimental

Os ensaios de cultivo de células de hibridomas foram realizados em frasco tipo *spinner* de eixo fixo central de agitação com volume de trabalho de 200mL, utilizando o meio de cultura DMEM completo com 10% (v/v) SFB. Após obtenção de concentração celular suficiente em frasco T75cm² para a realização dos experimentos, as células de hibridomas entre as passagens 17 e 20 foram inoculadas em frasco tipo *spinner* de eixo de agitação fixo e incubados em estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ para realização dos ensaios estabelecidos pelo planejamento fatorial completo para duas variáveis (2²).

3.3. Metodologia Analítica

Alíquotas de 1mL do cultivo celular foram coletadas diariamente, centrifugadas a 180xg por 5 minutos e os sobrenadantes armazenados à temperatura de -70°C para posterior realização de determinações analíticas.

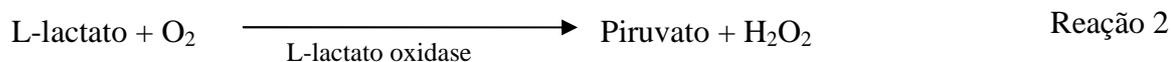
3.3.1. Monitoramento do Crescimento e da Viabilidade Celular

A concentração e viabilidade celular foram monitoradas através de microscopia óptica (Nikon-Eclipse TS100). A distinção de células viáveis e não viáveis foi realizada pelo método de exclusão celular do corante Azul de Trypan (0,4%) (Sigma[®]) que se baseia na permeabilidade seletiva da membrana celular, em que as células mortas se coram de azul enquanto as células vivas, com membrana íntegra, permanecem incolores (Freshney 1994).

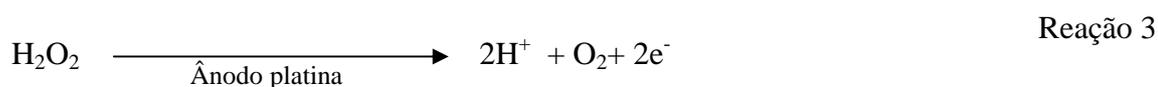
A concentração celular foi determinada por contagem em hemocitômetro (Bright-Line) preenchido com uma mistura de 10µL de corante azul de trypan (0,4%) e 90µL de sobrenadante celular, e em seguida submetido à contagem celular em microscópio óptico com aumento de 200x.

3.3.2. Determinação da concentração de glicose e lactato nos sobrenadantes de cultivo celular

As concentrações de glicose e lactato nos sobrenadantes dos cultivos celulares foram determinadas através do analisador bioquímico YSI 2700 Analyzer (Yellow Spring Instruments, EUA). A metodologia do equipamento baseia-se no emprego de enzimas imobilizadas em membranas de policarbonato para a detecção de substâncias químicas. A glicose ou lactato presente na amostra difunde-se através da membrana e é submetida à Reação 1 e 2, respectivamente.



O peróxido de hidrogênio gerado é então oxidado em um eletrodo de platina, segundo a Reação 3.



Os elétrons gerados são quantificados e a resposta é convertida na concentração da substância de interesse.

3.3.3. Determinação da concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA em sobrenadantes de cultivo celular por Imunoensaio Enzimático (ELISA)

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA presente nos sobrenadantes de cultivo celular foram quantificados por técnica de Imunoensaio Enzimático direto (ELISA) adaptado de Senna et al. (2003). Para o ensaio foram utilizadas microplaca NUNC MaxisorpTM, onde foi adicionados 0,25 µg/poço de proteína recombinante purificada PBP2a diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0. Após incubação *overnight* à temperatura de 4°C para adsorção do antígeno, foram efetuadas três lavagens com PBS-T (Solução Tampão Fosfato de Sódio 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05% pH 7,2). Em seguida, foi realizado o bloqueio com 200µL/poço de PBS-*milk* 5% (Solução Tampão Fosfato de Sódio 10mM, NaCl 150mM, leite desnatado 5% (p/v)) e a reação incubada a 37°C por 2 horas. Após incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e realizada três lavagens com PBS-T.

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a purificado foi diluído em PBS-*milk* 5% (p/v) de modo a obter as concentrações entre 50ng e 0,75ng por poço, em um volume final de 100µL. Os sobrenadantes provenientes do cultivo também foram diluídos em PBS-*milk* 5% (p/v). A reação foi novamente incubada a 37°C por 2 horas e após 3 lavagens com PBS-T, foi adicionado 100µL/poço da Imunoglobulina anti-mouse conjugada HRP (Sigma[®]), na diluição de 1:10.000 em PBS-*milk* 5% (p/v). Após incubação por 90 minutos a 37°C, procederam-se novamente três lavagens com PBS-T seguido da adição de 100µL/poço do cromógeno TMB

(Tetrametilbenzidina 1% (v/v), Sigma[®]) e incubado por 5 a 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N e as densidades óticas determinadas a um comprimento de onda de 450nm em leitor de microplaca SUNRISE[™] (Tecan[®]).

Foi construída uma curva de calibração correlacionando a absorvância e a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA purificado. Os valores de absorvância das amostras foram interpolados utilizando um intervalo de confiança de 95% para realizar a quantificação de anticorpos monoclonais presentes nos sobrenadantes dos cultivos celulares. As amostras cujos valores de absorvância apresentaram-se acima do valor de quantificação da curva de calibração foram diluídas, de modo a permitir que passassem a apresentar valores compreendidos na faixa linear da curva de calibração.

3.3.4. Determinação de variáveis cinéticas de crescimento e metabolismo celular

A partir dos resultados das análises dos sobrenadantes dos cultivos celulares foram calculados parâmetros para avaliar o crescimento e metabolismo celular, tais como, taxa específica de crescimento celular da fase exponencial (μ_{exp}), tempo de duplicação celular (t_d), taxa específica de consumo de glicose (q_{Glic}), taxa específica de produção de lactato (q_{Lac}), taxa específica de formação de anticorpo monoclonal (q_{mab}), coeficiente de rendimento de células a partir de glicose ($Y_{x/glic}$) e coeficiente de rendimento de anticorpo monoclonal a partir de glicose ($Y_{mab/glic}$).

Na fase exponencial de crescimento, a taxa específica de crescimento, a taxa específica de consumo de nutrientes e a taxa específica de produção de metabólito e produto são mantidas constantes (Legazpi et al. 2005).

A velocidade de crescimento celular máxima determinada na fase exponencial de crescimento (μ_{exp}) foi obtida através do coeficiente angular da reta ajustada para a variação do Logaritmo Neperiano da concentração celular *versus* o tempo, durante o período de crescimento exponencial. Sendo calculada através da Equação 1.

$$\mu_{exp} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 1}$$

No qual, μ_{exp} corresponde à taxa específica de crescimento celular, X à concentração celular e t ao tempo de cultivo.

Uma vez determinada a taxa específica de crescimento celular, o tempo de duplicação (t_d) foi calculado segundo a Equação 2.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{exp}} \quad \text{Equação 2}$$

As taxas específicas de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}) e as taxas relacionadas ao metabolismo celular foram determinadas através da relação entre seus valores médios e a integral da concentração de células viáveis ao longo do tempo (ICV) (Chen 2012).

A taxa de produção específica de anticorpo monoclonal na fase exponencial de crescimento celular (q_{mab}) foi determinada através da Equação 3 que, após ser rearranjada, pode ser escrita de forma que a variável integral de células viáveis ao longo do tempo (ICV) possa ser utilizada, conforme apresentado na Equação 4.

$$q_{mab} = \frac{1}{X} \frac{d[mab]}{dt} \quad \text{Equação 3}$$

$$C_{mab} = q_{mab} \int X dt \quad \text{Equação 4}$$

Na qual, C_{mab} é a concentração de anticorpo, q_{mab} é a taxa específica de formação de anticorpo monoclonal e $\int X dt$ corresponde ao ICV (Ozturk et al. 1991).

A taxa específica de consumo de glicose e formação de lactato foi determinada através da Equação 5 e 6, respectivamente (Acosta et al. 2007).

$$q_{Glic} = \frac{1}{Xv} \frac{d[Glic]}{dt} \quad \text{Equação 5}$$

$$q_{Lac} = \frac{1}{Xv} \frac{d[Lac]}{dt} \quad \text{Equação 6}$$

Sendo $Glic$ a concentração de glicose, Lac a concentração de lactato e Xv a concentração de células viáveis.

O coeficiente de rendimento de células a partir de glicose foi calculado de acordo com a equação 7:

$$Y_{X/Glic} = \frac{X_t - X_0}{Glic_t - Glic_0} \quad \text{Equação 7}$$

onde $Glic_t$ é a concentração de glicose no instante t, $Glic_0$ é a concentração de glicose no instante inicial, X_t é a concentração de células viáveis no instante t e X_0 é a concentração de células no instante inicial.

O coeficiente de rendimento de anticorpo monoclonal a partir de glicose foi calculado de acordo com a equação 8:

$$Y_{mab/Glic} = \frac{mab_t - mab_0}{Glic_t - Glic_0} \quad \text{Equação 8}$$

onde, $Glic_t$ é a concentração de glicose no instante t, $Glic_0$ é a concentração de glicose no instante inicial, mab_t é a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a no instante t e mab_0 é a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a no instante inicial.

4. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados de crescimento celular, produção de anticorpo monoclonal, consumo de substratos e formação de metabólitos dos experimentos propostos pelo planejamento fatorial completo 2^2 mostrando a relação dos fatores - velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial na secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, bem como a influência destes fatores em relação à taxa específica de produção de anticorpo monoclonal mostrada no planejamento fatorial completo 2^3 .

4.1. Avaliação do número de passagens das células de hibridoma, clone 90/DA5/CB5/AA3, e sua influência na obtenção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA

As células de hibridomas, clone 90DA5/CB5/AA3, nas passagens número 10, 15 e 20, cultivadas em placas de 24 orifícios, ao fim do oitavo dia de cultivo apresentaram as concentrações de $4,8 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$; $5,0 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ e $5,7 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, respectivamente. As células de hibridoma nas passagens número 30, 40 e 50 apresentaram concentrações de $1,5 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$; $0,21 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$ e $0,025 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$ de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) ao fim do oitavo dia de cultivo de células de hibridomas cultivado em diferentes passagens em placas de 24 orifícios. Média \pm Desvio padrão (n=2)

Número da passagem	C_{mab} ($\mu\text{g/mL}$)
10	$4,8 \pm 0,4$
15	$5,0 \pm 0,4$
20	$5,7 \pm 0,7$
30	$1,5 \pm 0,2$
40	$0,21 \pm 0,02$
50	$0,025 \pm 0,002$

4.2. Avaliação do cultivo de células de hibridoma cultivadas em frasco tipo *spinner*

4.2.1 Cinética celular da condição experimental denominada de ponto central do planejamento fatorial completo 2^2

As células de hibridomas foram cultivadas em frascos tipo *spinner* de eixo fixo central de agitação utilizando uma concentração do inóculo celular inicial de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 70rpm, conforme estabelecido pela condição do ponto central do planejamento fatorial completo 2^2 . Os cultivos da condição experimental do ponto central (ensaio ponto central) foram realizados em triplicata sendo os valores médios com seus respectivos desvios das cinéticas de crescimento celular, produção de anticorpo monoclonal, consumo de substrato e formação de metabólitos apresentados nas Figuras 4.1A e 4.1B.

Na cinética celular da condição experimental denominada de ponto central (cinética do ponto central), a concentração celular inicial do inóculo no dia 0 (zero) foi de $1,3 \pm 0,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e de $2,0 \pm 0,1 \times 10^5$ células viáveis/mL ao fim do primeiro dia de cultivo, mostrando um aumento de 1,4 vezes na concentração de células viáveis, no segundo dia com relação ao dia 0. No primeiro dia de cultivo a concentração celular foi de $2,0 \pm 0,1 \times 10^5$ células viáveis/mL e no segundo dia de cultivo a concentração celular máxima atingida foi de $3,9 \pm 0,8 \times 10^5$ células viáveis/mL, com uma fase exponencial de crescimento celular de um dia conforme mostrado na Figura 4.1A. No terceiro dia de cultivo a concentração de células foi de $2,4 \pm 0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL, concentração celular menor que a do segundo dia de cultivo que foi de $3,9 \pm 0,8 \times 10^5$ células viáveis/mL, sendo que no quarto e quinto dias de cultivo as concentrações celulares foram de $1,3 \pm 0,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e $0,4 \pm 0,1 \times 10^5$ células viáveis/mL, respectivamente. A concentração de células viáveis diminuiu a partir do segundo dia de cultivo e no sexto dia atingiu a concentração celular de $0,5 \pm 0,1 \times 10^5$ células viáveis/mL, no sétimo dia de cultivo a concentração de células foi de $0,4 \pm 0,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e no oitavo dia de cultivo a concentração celular foi de $0,6 \pm 0,3 \times 10^5$ células viáveis/mL, indicando que as células entraram em fase de declínio e morte celular, conforme mostrado na Figura 4.1A.

Na cinética do ponto central a secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA ocorreu a partir do primeiro dia de cultivo em que a concentração foi de $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$. No dia 0 (zero) a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi $0 \mu\text{g/mL}$ e no segundo dia a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de

MRSA foi de $13 \pm 1 \mu\text{g/mL}$. A concentração máxima de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi de $25 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ no terceiro dia de cultivo.

As concentrações de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA a partir do terceiro dia de cultivo foram de $20 \mu\text{g/mL}$ no quarto dia de cultivo, $25 \mu\text{g/mL}$ no quinto dia de cultivo, $23 \mu\text{g/mL}$ no sexto dia de cultivo, $21 \mu\text{g/mL}$ e $20 \mu\text{g/mL}$ no sétimo e oitavo dias de cultivo, respectivamente, conforme mostrado na Figura 4.1A.

Ao realizar a dosagem de glicose do meio DMEM utilizado no cultivo das células de hibridomas, a concentração de glicose inicial encontrada no meio no dia 0 (zero) foi de $0,905 \pm 0,003 \text{g/L}$, conforme mostrado na figura 4.1B. No primeiro dia do cultivo celular a concentração de glicose foi de $0,557 \text{g/L}$, no segundo dia de cultivo a concentração de glicose foi de $0,192 \text{g/L}$ e no terceiro dia de cultivo a concentração de glicose foi de 0g/L (zero g/L), permanecendo em 0g/L até o último dia do cultivo (oitavo dia), conforme mostrado na Figura 4.1B.

No decorrer do cultivo das células de hibridomas secretoras de anticorpo anti-PBP2a de MRSA, a concentração de lactato aumentou do dia zero ($0,153 \pm 0,005 \text{g/L}$) até o segundo dia de cultivo quando a concentração máxima de lactato foi de $0,517 \pm 0,014 \text{g/L}$. A concentração de lactato foi de $0,415 \pm 0,053 \text{g/L}$ no terceiro dia de cultivo, e $0,042 \pm 0,04 \text{g/L}$ no quarto dia de cultivo, sendo que do quinto ao oitavo e último dias de cultivo a concentração de lactato foi de 0g/L (zero g/L), conforme mostrado na Figura 4.1B.

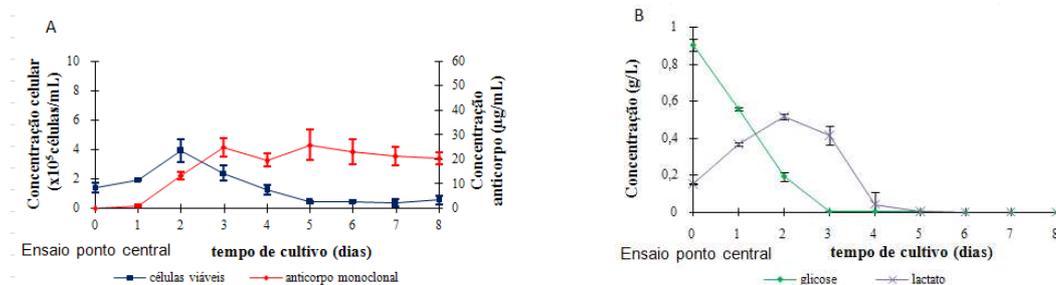


Figura 4.1: Cultivo celular referente ao ensaio do ponto central do planejamento fatorial completo 2^2 . Concentração celular do inóculo inicial: $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 70rpm. (A) Crescimento celular e concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA. (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato.

4.2.2. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 1 do planejamento fatorial completo 2^2

As células de hibridomas, da condição experimental denominada de ensaio 1, foram cultivadas em frascos tipo *spinner* de eixo fixo central de agitação utilizando uma concentração de inóculo celular inicial de $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 40rpm, conforme estabelecido pelo planejamento fatorial completo 2^2 .

As cinéticas de crescimento celular e secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA são apresentadas na Figura 4.2A, e as cinéticas de consumo de glicose e formação de lactato são apresentadas na Figura 4.2B.

Na condição experimental denominada de ensaio 1 (ensaio 1) não foi possível determinar a fase exponencial de crescimento celular devido a problemas encontrados na realização do experimento que impossibilitaram a continuidade do cultivo a partir do segundo dia de cultivo. Com os dados obtidos do ensaio 1, foi possível verificar que a concentração celular no primeiro dia de cultivo foi de $1,0 \times 10^5$ células viáveis/mL, que corresponde a 1,7 vezes maior que a concentração do inóculo celular inicial utilizada no dia 0 (zero). No segundo dia de cultivo, a concentração celular foi de $1,5 \times 10^5$ células viáveis/mL, que corresponde a 2,5 vezes a concentração do inóculo celular inicial utilizada no dia zero. Sendo que a concentração de células do primeiro dia de cultivo para o segundo dia de cultivo aumentou em 1,5 vezes, conforme mostrado na Figura 4.2A.

No dia 0 (zero) a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi de $0 \mu\text{g/mL}$ e no segundo dia a concentração de anticorpo monoclonal foi de $9 \mu\text{g/mL}$, conforme mostrado na Figura 4.2A.

No dia 0 (zero) da cinética, a concentração de glicose inicial foi de $0,96 \text{g/L}$, no primeiro dia de cultivo a concentração de glicose foi de $0,74 \text{g/L}$ e no segundo dia de cultivo a concentração de glicose foi de $0,48 \text{g/L}$. A concentração de lactato aumentou do dia zero de cultivo até o segundo dia de cultivo em que a concentração foi de $0,45 \text{g/L}$, conforme mostrado na Figura 4.2B.

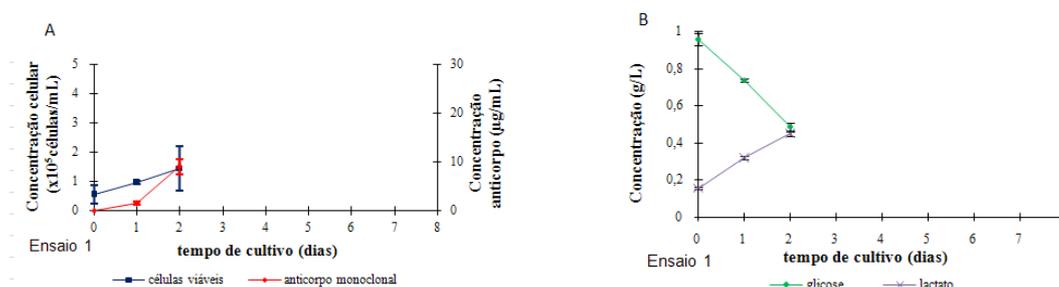


Figura 4.2: Cultivo celular referente ao ensaio 1 do planejamento fatorial completo 2^2 . Concentração celular do inóculo inicial: $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 40rpm. (A) Crescimento celular e concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA. (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato.

4.2.3. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 2 do planejamento fatorial completo 2^2

As células de hibridomas, da condição experimental denominada de ensaio 2, foram cultivadas em frascos tipo *spinner* de eixo fixo central de agitação utilizando uma

concentração de inóculo celular inicial de $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 100rpm, conforme estabelecido pelo planejamento fatorial completo 2^2 .

As cinéticas de crescimento celular e secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA do ensaio 2 são apresentadas na Figura 4.3A, e as cinéticas de consumo de glicose e formação de lactato, são apresentados na Figura 4.3B.

Na cinética celular do ensaio 2, a concentração do inóculo celular inicial no dia 0 (zero) foi de $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL e a concentração de células no primeiro dia de cultivo foi de 1×10^5 células viáveis/mL, que corresponde a um aumento de 1,6 vezes a concentração de células viáveis utilizadas no dia 0 (zero). O ensaio 2 apresentou uma fase exponencial de dois dias com concentração máxima celular de $5,7 \times 10^5$ células viáveis/mL no terceiro dia de cultivo, como pode ser observado na Figura 4.3A. No quarto dia a concentração de células viáveis foi de $4,5 \times 10^5$ células viáveis/mL, indicando que as células entraram em fase de declínio e morte celular, conforme mostrado na Figura 4.3A. A partir do quarto dia de cultivo houve redução na concentração de células viáveis, sendo que a concentração celular de $1,2 \times 10^5$ células viáveis/mL no sexto dia de cultivo foi similar à concentração de $0,8 \times 10^5$ células viáveis/mL no oitavo dia de cultivo (último dia).

Na cinética do ensaio 2, a secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA ocorreu a partir do dia zero. No dia 0 (zero) a concentração de anticorpo monoclonal foi $0 \mu\text{g/mL}$, logo após o inóculo, porém, houve um aumento entre o dia zero e o primeiro dia de cultivo, sendo que no segundo dia de cultivo a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi de $14 \mu\text{g/mL}$. A concentração de anticorpo monoclonal aumentou até o terceiro dia de cultivo celular, quando a concentração máxima foi de $30 \mu\text{g/mL}$. As concentrações de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA no quarto, quinto, sexto, sétimo e oitavo dias foram de $35 \mu\text{g/mL}$, $38 \mu\text{g/mL}$, $35 \mu\text{g/mL}$, $37 \mu\text{g/mL}$ e $35 \mu\text{g/mL}$ conforme mostrado na Figura 4.3A.

A concentração de glicose inicial encontrada no meio DMEM no dia 0 (zero) foi de $0,96 \text{g/L}$. No decorrer do cultivo celular a concentração de glicose diminuiu para $0,725 \text{g/L}$ no primeiro dia; $0,389 \text{g/L}$ no segundo dia e $0,155 \text{g/L}$ no terceiro dia de cultivo, o que corresponde a uma redução de 25%, 59% e 83% em relação a concentração de glicose inicial (do dia zero), respectivamente, conforme mostrado na Figura 4.3B. A concentração de lactato aumentou do dia zero até o segundo dia de cultivo quando a concentração máxima foi de $0,53 \text{g/L}$, reduzindo para $0,369 \text{g/L}$ no quarto dia de cultivo e para 0g/L a partir do sexto dia de cultivo, conforme mostrado na Figura 4.3B.

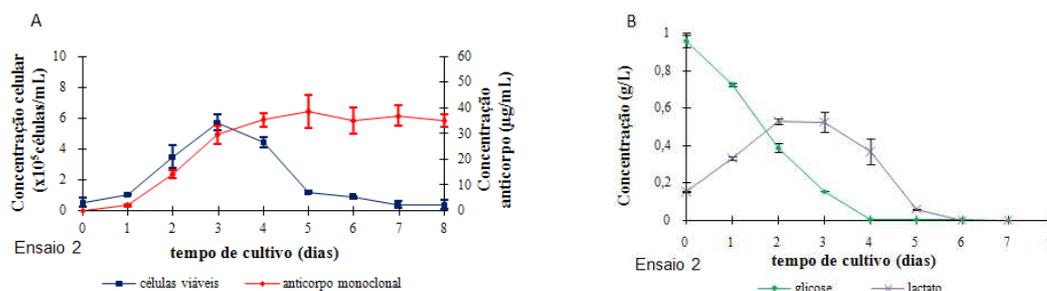


Figura 4.3: Cultivo celular referente ao ensaio 2 do planejamento fatorial 2^2 . Concentração celular inicial= $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 100rpm. (A) Crescimento celular e dosagem de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato.

4.2.4. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 3 do planejamento fatorial completo 2^2

As células de hibridoma foram cultivadas em frascos tipo *spinner* de eixo fixo central de agitação utilizando uma concentração celular inicial de $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e agitação de 40rpm, conforme estabelecido pela condição do ensaio 3 do planejamento fatorial completo 2^2 . A cinética de crescimento celular, produção de anticorpo monoclonal, consumo de glicose e formação de lactato do ensaio 3, são apresentados na Figura 4.4A e 4.4B.

Na condição experimental denominada de ensaio 3 (ensaio 3) não foi possível determinar a fase exponencial de crescimento celular devido a problemas encontrados na realização do experimento que impossibilitaram a continuidade do cultivo a partir do segundo dia de cultivo. Com os dados obtidos do ensaio 3, foi possível verificar que a concentração celular no primeiro dia de cultivo foi de $1,7 \times 10^5$ células viáveis/mL, que corresponde a 1,3 vezes menor que a concentração do inóculo celular inicial utilizada no dia 0 (zero).

No segundo dia de cultivo, a concentração celular foi de $1,1 \times 10^5$ células viáveis/mL, que corresponde a metade da concentração do inóculo celular inicial utilizada no dia zero. Sendo que a concentração de células do primeiro dia de cultivo para o segundo dia de cultivo diminuiu em 1,2 vezes, conforme mostrado na Figura 4.4 A.

No dia 0 (zero) a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi de $0 \mu\text{g/mL}$ e no segundo dia a concentração de anticorpo monoclonal foi de $8 \mu\text{g/mL}$, conforme mostrado na Figura 4.4A.

No dia 0 (zero) da cinética, a concentração de glicose inicial foi de $0,98 \text{g/L}$, no primeiro dia de cultivo a concentração de glicose foi de $0,42 \text{g/L}$ e no segundo dia de cultivo a concentração de glicose foi de $0,08 \text{g/L}$. A concentração de lactato aumentou do dia zero de cultivo até o segundo dia de cultivo em que a concentração foi de $0,59 \text{g/L}$, conforme mostrado na Figura 4.4B.

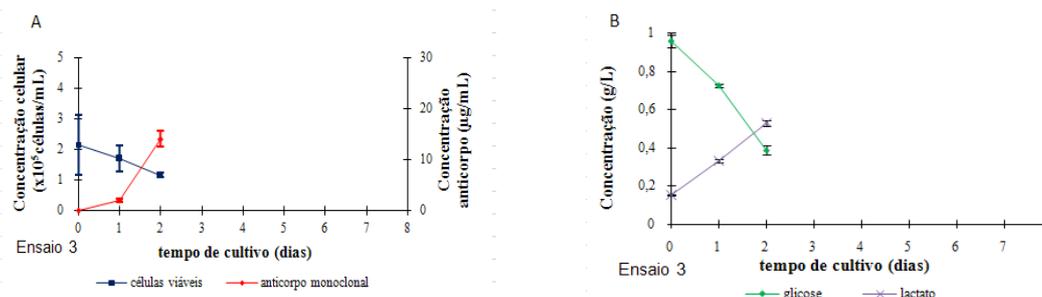


Figura 4.4: Cultivo celular referente ao ensaio 3 do planejamento fatorial 2^2 . Concentração celular inicial= $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 40rpm. (A) Crescimento celular e dosagem de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato

4.2.5. Cinética celular da condição experimental denominada de ensaio 4 do planejamento fatorial completo 2^2

As células de hibridomas, da condição experimental denominada de ensaio 4, foram cultivadas em frascos tipo *spinner* de eixo fixo central de agitação utilizando uma concentração de inóculo celular inicial de $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 100rpm, conforme estabelecido pelo planejamento fatorial completo 2^2 .

As cinéticas de crescimento celular e secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA do ensaio 4 são apresentadas na Figura 4.5A, e as cinéticas de consumo de glicose e formação de lactato, são apresentados na Figura 4.5B.

Na cinética celular do ensaio 4, a concentração do inóculo celular inicial no dia 0 (zero) foi de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e a concentração de células no primeiro dia de cultivo foi de $3,3 \times 10^5$ células viáveis/mL, que corresponde a um aumento de 1,5 vezes a concentração de células viáveis utilizadas no dia 0 (zero). O ensaio 4 apresentou uma fase exponencial de um dia com concentração máxima celular de $6,2 \times 10^5$ células viáveis/mL no segundo dia de cultivo, como pode ser observado na Figura 4.5A. No terceiro dia a concentração de células viáveis foi de $2,0 \times 10^5$ células viáveis/mL, indicando que as células entraram em fase de declínio e morte celular, conforme mostrado na Figura 4.5A. A partir do terceiro dia de cultivo houve redução na concentração de células viáveis, sendo que a concentração celular de $1,0 \times 10^5$ células viáveis/mL no quarto dia de cultivo foi similar à concentração de $0,7 \times 10^5$ células viáveis/mL no oitavo dia de cultivo (último dia).

Na cinética do ensaio 4, a secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA ocorreu a partir do dia zero. No dia 0 (zero) a concentração de anticorpo monoclonal foi $0 \mu\text{g/mL}$, logo após o inóculo, porém, houve um aumento entre o dia zero e o primeiro dia de cultivo, sendo que no segundo dia de cultivo a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi de $26 \mu\text{g/mL}$. A concentração de anticorpo monoclonal aumentou até o

terceiro dia de cultivo celular, quando a concentração máxima foi de 40 μ g/mL. As concentrações de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA no quarto, quinto, sexto, sétimo e oitavo dias foram de 37 μ g/mL, 38 μ g/mL, 37 μ g/mL, 42 μ g/mL e 43 μ g/mL conforme mostrado na Figura 4.5A.

A concentração de glicose inicial encontrada no meio DMEM no dia 0 (zero) foi de 0,96g/L. No decorrer do cultivo celular a concentração de glicose diminuiu para 0,39g/L no primeiro dia e 0 g/L no terceiro dia de cultivo, o que corresponde a uma redução de 59% e 100% em relação a concentração de glicose inicial (do dia zero), respectivamente, conforme mostrado na Figura 4.5B. A concentração de lactato aumentou do dia zero até o segundo dia de cultivo quando a concentração máxima foi de 0,53g/L, reduzindo para 0g/L a partir do terceiro dia de cultivo, conforme mostrado na Figura 4.5B.

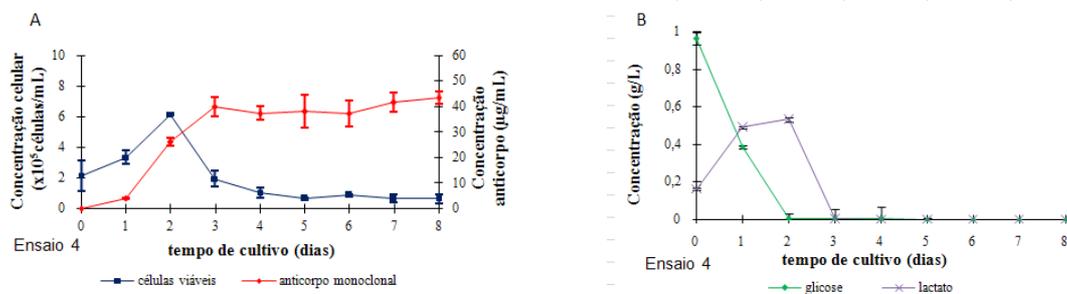


Figura 4.5: Cultivo celular referente ao ensaio 4 do planejamento fatorial 2^2 . Concentração celular inicial= 2,2 $\times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 100rpm. (A) Crescimento celular e dosagem de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (B) Dosagem bioquímica de glicose e lactato

4.2.6. Determinação de parâmetros cinéticos e bioquímico-metabólicos dos cultivos do planejamento fatorial completo 2^2

Para sistematizar a análise dos efeitos das variáveis, tais como, concentração celular inicial e velocidade de agitação nos cultivos celulares de hibridomas, foram determinados os parâmetros cinéticos e bioquímico-metabólicos na fase exponencial de crescimento celular: velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de duplicação (t_d), taxa específica de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}), taxa específica de consumo de glicose (q_{Glic}), taxa específica de formação de lactato (q_{Lac}), coeficiente de rendimento celular em relação ao consumo de glicose ($Y_{\text{Xv/glic}}$) e coeficiente de rendimento de anticorpo monoclonal em relação ao consumo de glicose ($Y_{\text{mab/glic}}$), conforme mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Concentração máxima de células viáveis (X_v), taxa específica de crescimento celular (μ_{max}), tempo de duplicação (t_d), concentração máxima de anticorpo (C_{mab}), taxa específica de produção de anticorpo na fase exponencial ($q_{Ac\ exp}$), taxa específica de consumo de glicose (q_{Glic}), taxa específica de formação de lactato (q_{Lac}), coeficiente de rendimento celular em relação ao consumo de glicose ($Y_{Xv/glic}$) e coeficiente de rendimento de anticorpo monoclonal em relação ao consumo de glicose ($Y_{mab/glic}$) das células de hibridomas cultivadas em frasco tipo *spinner* em meio DMEM completo com 10% (v/v) de SFB.

Ensaio	X_v (10^5 cel/mL)	μ_{max} (dia ⁻¹)	t_d (dia)	C_{mab} (μ g/mL)	q_{mab} (pg/cel*dia)	q_{Glic} (pg/cel*dia)	q_{Lac} (pg/cel*dia)	$Y_{Xv/glic}$ (10^5 cel/g)	$Y_{mab/glic}$ (μ g/g)
1*	1,5*	nd	nd	9*	nd	nd	nd	nd	nd
2	5,7	0,85	0,82	35	2,0	0,00148	0,00088	7	48
3*	1,1*	0	0	8*	nd	nd	nd	nd	nd
4	6,2	0,61	1,14	40	2,1	0,00081	0,00009	7	94
Ponto central	$3,9 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$	25 ± 4	$1,7 \pm 0,2$	\pm	\pm	5 ± 2	34 ± 2
						0,00125	0,00051		
						0,00009	0,00004		

* determinado no segundo dia de cultivo
nd: não determinado.

4.3. Efeitos da concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação sobre o crescimento celular e produção de anticorpo

Como a fase exponencial de crescimento celular iniciou-se ao fim do primeiro dia de cultivo, os resultados coletados no segundo dia são mais representativos do comportamento celular, uma vez que no primeiro dia as células encontram-se em fase de adaptação (*lag*). Por esse motivo, os dados referentes ao segundo dia de cultivo foram escolhidos para serem utilizados na realização do planejamento fatorial completo 2^2 .

Os resultados provenientes das determinações analíticas dos sobrenadantes do cultivo celular, coletados ao fim do segundo dia de cultivo foram organizados de acordo com a proposta estabelecida pelo planejamento fatorial completo 2^2 na forma de matriz experimental apresentada na Tabela 4.3.

A concentração celular observada ao fim do segundo dia de cultivo variou de $1,2 \cdot 10^5$ a $6,2 \cdot 10^5$ células viáveis/mL nos ensaios 1 e 3 (velocidade de agitação de 40rpm e concentração do inóculo celular inicial de $0,6$ e $2,2 \cdot 10^5$ células viáveis/mL, respectivamente) a $6,2 \cdot 10^5$ células viáveis/mL no ensaio 4 (velocidade de agitação de 100rpm e concentração celular inicial de $2,2 \cdot 10^5$ células viáveis/mL) conforme mostrado na Tabela 4.1. A diferença de 5,2 vezes na concentração celular dos ensaios 1 e 4 indica a existência de que algumas das variáveis avaliadas apresentaram influência sobre a concentração celular ao fim do segundo dia de cultivo. Através da realização dos ensaios do ponto central realizado em triplicata, foi obtida uma concentração celular média de $3,9 \cdot 10^5$ células viáveis/mL com desvio padrão de $0,8 \cdot 10^5$ células viáveis/mL e desvio padrão relativo de 19,2%.

Tabela 4.3: Matriz experimental e resultados da concentração celular (X_v) e concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) obtidos ao fim do segundo dia de cultivo através do planejamento fatorial completo 2^2 .

Ensaio	X_1	X_2	X_v	C_{mab}
	Concentração celular inicial	Velocidade agitação	Concentração celular ($\times 10^5$ células viáveis/mL)	Concentração de anticorpo monoclonal ($\mu\text{g/mL}$)
1	-1	-1	1,5	9
2	-1	+1	3,5	14
3	+1	-1	1,2	8
4	+1	+1	6,2	26
5	0	0	3,9	13
6	0	0	4,7	15
7	0	0	3,2	12

As maiores concentrações de anticorpo monoclonal foram observadas no ensaio 4 (26 $\mu\text{g/mL}$) em que a concentração do inóculo celular inicial de $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL foi adicionada em frasco *spinner* mantido sob agitação de 100rpm. Uma variação na concentração de anticorpo monoclonal de aproximadamente 3,3 vezes indicou a existência de que as variáveis avaliadas apresentaram influência sobre a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA ao fim do segundo dia de cultivo. De acordo com os dados obtidos a partir dos ensaios do ponto central o processo pode ser considerado confiável já que apresentou desvio padrão relativo de 11,4%.

Através do programa computacional “Statistica”, foram calculados os efeitos das variáveis independentes (concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação) e suas interações sobre as respostas: concentração celular máxima e concentração de anticorpo monoclonal ao fim do segundo dia de cultivo.

A significância dos efeitos das variáveis principais e suas interações foram verificadas pela análise do p -valor. De acordo com a análise estatística apresentada na Tabela 4.3, a velocidade de agitação foi a única variável que exerceu efeito significativo ($p=0,028$) sobre a concentração celular, quando considerado a um intervalo de confiança de 90%. O aumento da concentração celular verificada pode ser proveniente de uma melhoria no fornecimento de nutrientes e oxigênio para as células, a qual é favorecida pelo emprego de maiores velocidades de agitação (Legazpi et al. 2005).

Tabela 4.4: Efeitos estimados, erro padrão e *p*-valor para concentração de anticorpo e concentração do inóculo celular segundo planejamento fatorial completo para duas variáveis (2^2) para avaliação dos efeitos da concentração celular inicial e velocidade de agitação após o segundo dia de cultivo de hibridoma em frasco tipo *spinner*.

Fator	Concentração de anticorpo ($\mu\text{g/mL}$)			Concentração celular ($\times 10^5$ células viáveis/mL)		
	Efeito	Erro padrão	p-valor ^a	Efeito	Erro padrão	p-valor ^a
Média	13,9	0,5	0,000	3,5	0,3	0,002
Concentração celular inicial (X1)	5,5	1,4	0,031	1,2	0,9	0,266
Velocidade de agitação (X2)	11,5	1,4	0,004	3,5	0,9	0,028
X1 X2	6,5	1,4	0,019	1,5	0,9	0,186

^a Nível de significância para as variáveis e suas interações: $p < 0,1$ indica que a variável é estatisticamente significativa (destacado em negrito)

As duas variáveis analisadas, concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação, assim como suas interações apresentaram efeito significativo positivo a um intervalo de confiança de 90%, sobre a concentração de anticorpo monoclonal, conforme mostrado na Tabela 4.4. Comparando-se os *p*-valores, a velocidade de agitação é a variável que exerce maior influência sobre a concentração de anticorpo monoclonal encontrada em sobrenadantes de cultivo celular.

O aumento da velocidade de agitação de 40 para 100rpm no cultivo com menor concentração do inóculo celular inicial ($0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL) resultou no aumento de 1,5 vezes na concentração de anticorpo monoclonal obtida nos cultivos celulares dos ensaios 1 e 2, enquanto que um aumento maior, de 3,2 vezes, foi verificado nos cultivos que apresentaram maior concentração do inóculo celular inicial ($2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL) conforme mostrado no ensaio nos ensaios 3 e 4.

Um aumento na concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA no sobrenadante de cultivo celular pode ser decorrente da existência de uma maior concentração de células viáveis e ainda do emprego de condições que promovam estresse celular de modo a diminuir sua taxa de crescimento celular. O aumento na concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA quando maiores velocidades de agitação são empregadas está diretamente relacionada com o aumento da concentração de células viáveis nos cultivos (Ozturk et al. 1990).

Um aumento na concentração do inóculo celular inicial de $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL para $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL aumentou em 1,9 vezes a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA no sobrenadante do cultivo quando a velocidade de agitação empregada foi de 100rpm. Enquanto que em cultivos celulares agitados a 40rpm, o aumento na concentração do inóculo celular inicial não interferiu na concentração final de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA secretada. O termo de interação velocidade de agitação*concentração do inóculo celular inicial, a um intervalo de confiança de 90%, mostrou ser estatisticamente significativo, fortalecendo as observações realizadas anteriormente, de que o aumento da concentração do inóculo celular inicial favorece o aumento da concentração de anticorpo no sobrenadante celular quando maiores velocidades de agitação são empregadas.

O modelo matemático proposto para prever a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA no sobrenadante do cultivo celular em função das variáveis codificadas é representado por:

$$C_{\text{mab}} = 13,8 + 2,8X_1 + 5,8X_2 + 3,3X_1X_2$$

A partir do modelo matemático linear obtido, foi construído o gráfico de superfície resposta mostrado na Figura 4.6. Observa-se que a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA não atingiu um valor máximo na faixa de trabalho analisada, e que um aumento na velocidade de agitação e da concentração do inóculo celular inicial poderiam aumentar a concentração de anticorpo monoclonal obtida.

A primeira ferramenta estatística utilizada para validar o modelo matemático proposto para a determinação da concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foi a análise de variância (ANOVA) cujos resultados são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial completo 2^2 para concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	204,75	3	68,25	33,53
Resíduo	6,11	3	2,04	
Total	210,85			

$$F_{0,1\%, 3, 3} = 5,39$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 97,1\%$$

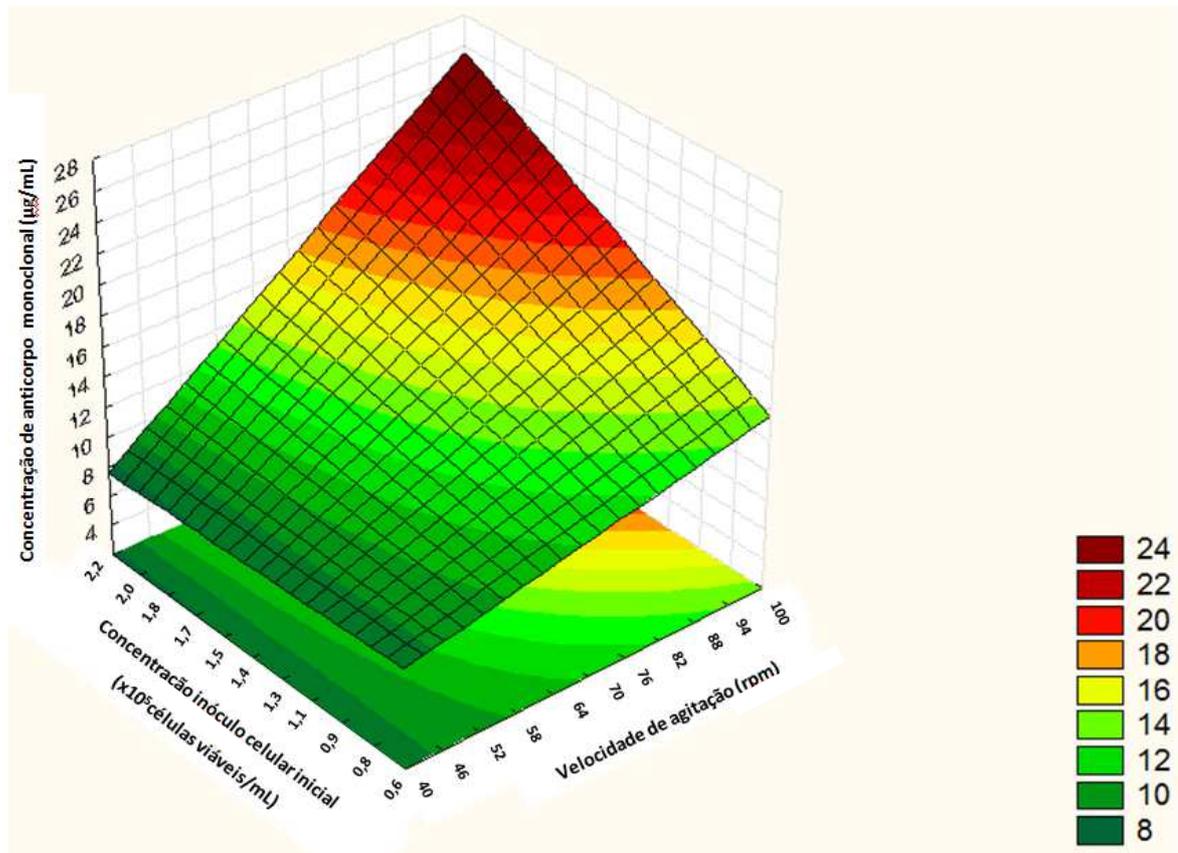


Figura 4.6: Gráfico superfície resposta para concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) para velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial, obtido a partir do planejamento fatorial completo 2^2 .

Comparando-se os valores de $F_{calculado}$ (33,53) e $F_{tabelado}$ (5,39), pode ser verificado que o modelo linear proposto é estatisticamente significativo e preditivo para a concentração de anticorpo monoclonal no segundo dia de cultivo, uma vez que o valor de $F_{calculado}$ foi maior que o valor de $F_{tabelado}$ em 6,2 vezes. Observa-se ainda que a porcentagem da variação explicada pelo modelo é de 97%.

O percentual de diferença entre a concentração de anticorpo monoclonal determinada experimentalmente e o valor da concentração de anticorpo monoclonal proposta pelo modelo também foi utilizado como ferramenta na verificação da capacidade preditiva do modelo matemático desenvolvido. Os erros relacionados ao modelo matemático proposto foram observados somente nos ensaios do ponto central e não ultrapassaram 16,7%, conforme mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Valores experimentais e preditos pelo modelo proposto para concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) anti-PBP2a de MRSA, segundo planejamento fatorial completo 2^2 .

Ensaio	C_{mab} ($\mu\text{g/mL}$)		Desvio (%)
	Experimental	Predito	
1	9	9	0
2	14	14	0
3	8	8	0
4	26	26	0
5	13	14	7,7
6	15	14	6,7
7	12	14	16,7

4.4. Efeito da concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo sobre a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA

As taxas específicas de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA entre o dia zero e o primeiro dia do cultivo celular e entre o primeiro e segundo dias do cultivo celular são apresentadas na Tabela 4.7 na forma de matriz experimental de acordo com a proposta de planejamento fatorial completo 2^3 .

Tabela 4.7: Matriz experimental e resultados obtidos através do planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaio	Concentração do inóculo celular inicial (X1)	Velocidade de agitação (X2)	Tempo de cultivo (X3)	Taxa específica de produção de anticorpo monoclonal q_{mab} (pg/célula*dia)
1	-1	-1	-1	1,5
2	-1	+1	-1	1,8
3	+1	-1	-1	0,7
4	+1	+1	-1	1,2
5	0	0	-1	0,7
6	0	0	-1	0,6
7	0	0	-1	0,6
8	-1	-1	+1	3,0
9	-1	+1	+1	2,0
10	+1	-1	+1	3,3
11	+1	+1	+1	2,1
12	0	0	+1	1,7
13	0	0	+1	1,6
14	0	0	+1	1,9

Foi observado que as taxas específicas de produção de anticorpos determinadas ao final do primeiro dia de cultivo, nível (-1), foram menores que as taxas específicas de produção de anticorpo calculadas, quando considerado os dados dos dois dias de cultivo disponíveis, nível (+1).

As maiores taxas específicas de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foram obtidas ao final do segundo dia de cultivo, nível (+1), sendo que seus maiores valores foram observados nos ensaios 8 e 10 do planejamento fatorial completo 2^3 , em que foi empregada velocidade de agitação de 40rpm. No ensaio 8, onde a concentração do inóculo celular inicial foi de $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL, foi verificada que a produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA ocorreu a uma taxa específica de 3,0pg/célula*dia, e que no ensaio 10 em que a concentração do inóculo celular inicial foi de $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL, uma taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA de 3,3 pg/célula*dia, foi observada. A diminuição da velocidade de agitação de 100rpm (ensaios 9 e 11) para 40rpm (ensaios 8 e 10) resultou em um aumento de 1,5 vezes na taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA.

A produtividade específica de anticorpo monoclonal pode aumentar quando fatores estimuladores do crescimento celular são utilizados, ou em consequência da utilização de condições de estresse impostas aos cultivos, tais como, alta osmolaridade, acúmulo de metabólitos ou ainda diminuição de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (Ozturk 1991).

Os resultados apresentados estão em conformidade com trabalhos descritos na literatura e indicam que a produtividade específica de anticorpos independe da concentração do inóculo celular inicial e que baixas velocidades de agitação utilizadas em cultivos de células de hibridomas podem contribuir com uma maior capacidade de secreção de anticorpos (Jang e Barford 2000). O aumento da produtividade específica de anticorpos pode estar relacionado com o estresse fisiológico gerado pela diminuição do oxigênio dissolvido no meio de cultivo, sendo que quanto menor a velocidade de agitação empregada ao cultivo celular, menor é a taxa de transferência de gases (Dutton et al. 1999).

Através do programa computacional “Statística”, foram calculados os efeitos das variáveis independentes (concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo) assim como suas interações sobre a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (q_{mab}) conforme dados mostrados na Tabela 4.8. A significância dos efeitos das variáveis principais e suas interações foram verificadas pela análise do “*p*-valor”, sendo considerados significativos os efeitos que apresentaram “*p*-valor” menor que 0,1.

Tabela 4.8: Efeitos estimados, erro padrão e p -valor para produtividade específica de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA segundo planejamento fatorial completo 2^3 para avaliação dos efeitos da concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo de hibridoma em frasco tipo *spinner*.

Fator	Produtividade específica de anticorpo		
	q_{mab} (pg/cel*dia)		
	Efeito	Erro padrão	p -valor ^a
Média	1,6	0,1	0,000
Concentração celular inicial ($X1$)	-0,3	0,4	0,512
Velocidade de agitação ($X2$)	-0,4	0,4	0,365
Tempo de cultivo ($X3$)	1,2	0,3	0,002
$X1 X3$	0,5	0,4	0,252
$X2 X3$	-0,8	0,4	0,073
$X1 X2$	0	0,4	1,000

^a Nível de significância para as variáveis e suas interações: $p < 0,1$ indica que a variável é estatisticamente significativa (destacado em negrito)

Como o efeito da interação concentração do inóculo celular inicial*tempo de cultivo foi nulo e, portanto, não significativo ($p=1,000$), este foi retirado do modelo matemático referente ao planejamento fatorial completo 2^3 a fim de evitar que outras variáveis que influenciem a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA pudessem ter seus efeitos não identificados (Rodrigues & Iemma 2009). A retirada de um termo da análise estatística permite aumento no número de graus de liberdade para a avaliação dos demais efeitos do modelo.

A variável tempo de cultivo e a interação linear entre as variáveis, velocidade de agitação e tempo de cultivo, exerceram efeito significativo sobre a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a (q_{mab}) quando considerado um intervalo de confiança de 90%.

A utilização de um planejamento fatorial completo para três variáveis (2^3) se justifica pela significância do efeito tempo de cultivo sobre a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA. No entanto, quando apenas as variáveis concentração do inóculo celular inicial e velocidade de agitação são avaliadas em um planejamento para duas variáveis, a observação de que o tempo de cultivo, assim como a interação tempo de cultivo*velocidade de agitação, apresentam efeito significativo sobre a resposta avaliadas, são perdidas. Cabe ressaltar que a produtividade avaliada foi normalizada pelo tempo, sendo considerada a produtividade específica de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (q_{mab}),

de forma a evitar que o tempo como variável interferisse inadequadamente sobre as respostas das demais variáveis do bioprocessamento, não permitindo avaliar seus efeitos com confiabilidade.

O modelo matemático proposto em função das variáveis codificadas (concentração do inóculo celular inicial, velocidade de agitação e tempo de cultivo) para a determinação da taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA é expresso por:

$$q_{\text{mab}} = 1,6 - 0,1X_1 - 0,2 X_2 + 0,6 X_3 + 0,2 X_1 X_3 - 0,4 X_2 X_3$$

A partir do modelo matemático linear obtido foi construído o gráfico de superfície resposta apresentado na Figura 4.7. Verificou-se que a velocidade de agitação inferior a 60rpm, que corresponde ao nível (-0,6) da variável independente velocidade de agitação, favoreceu o aumento da taxa específica de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}).

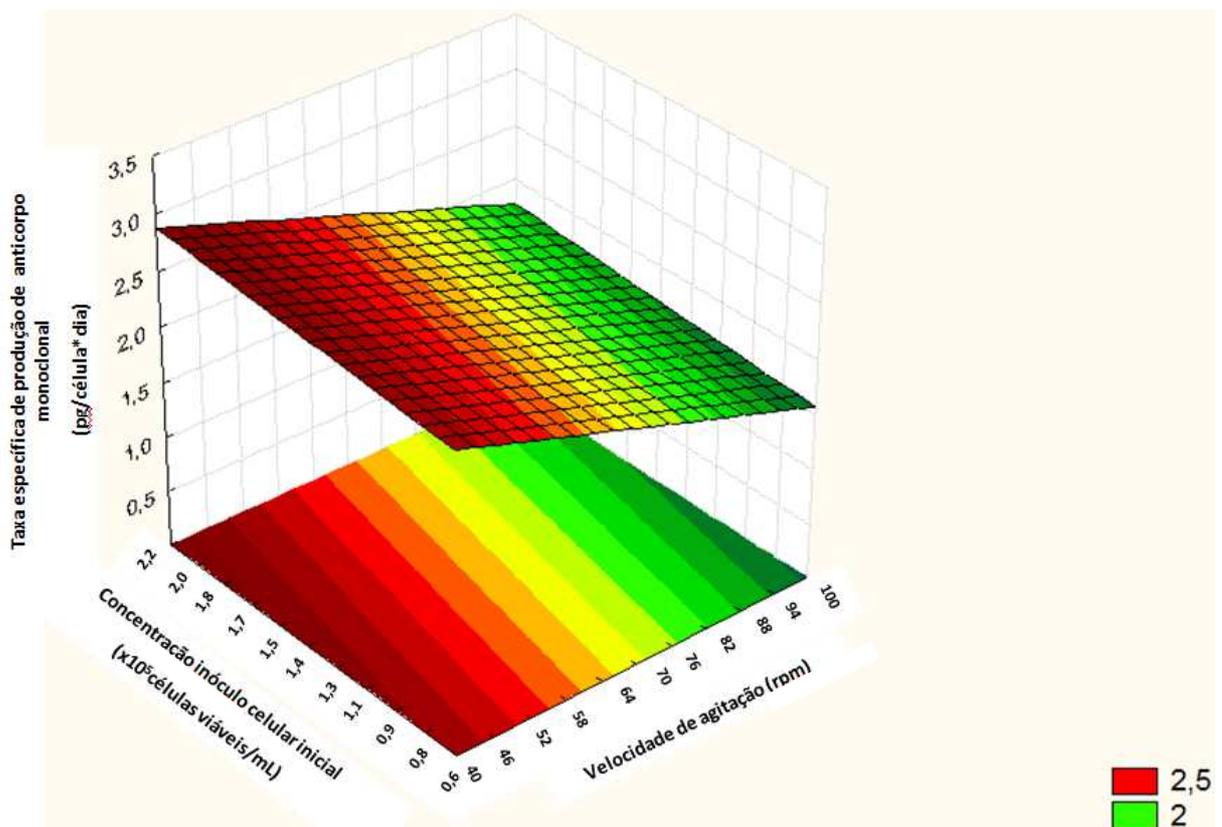


Figura 4.7: Gráfico superfície-resposta para taxa específica de produção de anticorpo monoclonal (q_{mab}) para velocidade de agitação e concentração do inóculo celular inicial, para o nível (+1) do tempo de cultivo celular, obtido a partir do planejamento fatorial completo 2^3 .

A significância do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA), sendo os resultados apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Análise de variância (ANOVA) do planejamento completo 2^3 para taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (q_{mab}).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{calculado}$
Regressão	7,06	5	1,41	5,32
Resíduo	2,12	8	0,27	
Total	9,18			

$F_{0.1\%, 5, 8} = 2,73$

% variação explicada (R^2) = 77%

O valor de $F_{calculado}$ foi de 5,32 e o valor de $F_{tabelado}$ foi de 2,73 para um intervalo de confiança de 95%. A capacidade explicativa apresentada pelo modelo foi de 77%.

O modelo matemático proposto para determinar a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi considerado validado pela análise de variância ao apresentar valor de $F_{calculado}$ 1,9 vezes maior que o valor de $F_{tabelado}$, como indicado por Rodrigues & Iemma (2009). Alguns autores, no entanto, afirmam que para um modelo matemático ser considerado estatisticamente significativo e preditivo, o valor de $F_{calculado}$ deve ser quatro a cinco vezes superior ao valor de $F_{tabelado}$ (Barros Neto et al. 1995). Portanto, para avaliar a qualidade de um modelo, outras análises devem ser feitas além das avaliações estatísticas, como ANOVA, sendo a principal delas a comparação entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo.

O percentual de diferença entre as taxas específicas de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA calculadas a partir dos dados experimentais e as taxas preditas pelo modelo matemático encontram-se na Tabela 4.10. Foi observado que os menores erros foram encontrados nos ensaios 8 (10,7%) e 10 (12,8%), nos quais foram obtidos os mais altos valores de q_{mab} experimentais, enquanto erros maiores de 69,1% foram verificados nos ensaios 6 e 7, que estão na faixa dos menores valores de q_{mab} obtidos experimentalmente. Como as condições que interessam neste trabalho para avaliação do processo são aquelas com maiores valores de q_{mab} , os erros foram considerados aceitáveis para a utilização do modelo para predição de condições do processo de produção do anticorpo.

Tabela 4.10: Valores experimentais e preditos pelo modelo matemático proposto para taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (q_{mab}) segundo planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaio	q_{mab} (pg/célula*dia)	q_{mab} (pg/célula*dia)	Desvio (%)
	experimental	predito	
1	1,5	1,2	22,4
2	1,8	1,6	13,1
3	0,7	0,5	33,7
4	1,2	0,9	28,0
5	0,7	1,0	44,9
6	0,6	1,0	69,1
7	0,6	1,0	69,1
8	3	2,7	10,7
9	2	1,6	21,1
10	3,3	2,9	12,8
11	2,1	1,8	15,3
12	1,7	2,2	31,1
13	1,6	2,2	39,3
14	1,9	2,2	17,3

4.5. Validação dos modelos matemáticos desenvolvidos

Foi inicialmente proposto a realização de 4 ensaios adicionais (V_1 , V_2 , V_3 e V_4) referentes aos pontos axiais de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), apresentado na Tabela 4.11.

Devido a mudanças das características da insulina, fornecida pelo fabricante, utilizada na suplementação do meio de cultivo, o ensaio V_4 não pode ser realizado, impossibilitando assim a identificação de possíveis efeitos quadráticos que melhor descrevesse o processo. Sabendo da necessidade da realização de ensaios adicionais ao término da realização do planejamento experimental, para comprovar experimentalmente as melhores condições preditas pelo modelo, associada a impossibilidade de realizar novos ensaios de cultivo celular, optou-se por utilizar os resultados disponíveis dos ensaios V_1 , V_2 e V_3 para validar o modelo matemático obtido.

Apesar da potencialidade do emprego da técnica de planejamento experimental, uma de suas limitações é que a predição de resposta só é realmente confiável, do ponto de vista estatístico, nas faixas estudadas durante o planejamento experimental, neste caso entre o nível

superior (+1) e nível inferior (-1), podendo somente indicar tendências de comportamento de um processo quando são realizadas previsões fora dessa faixa.

Tabela 4.11: Valores das variáveis codificadas e reais dos ensaios utilizados propostos para realização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde X_1 , V_1 = velocidade de agitação (rpm) codificada e real e X_2 , V_2 =concentração do inóculo celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL) codificada e real, respectivamente.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X_1	X_2	V_1	V_2
	Velocidade Agitação	Concentração do inóculo celular inicial	Velocidade Agitação (rpm)	Concentração do inóculo celular inicial ($\times 10^5$ células viáveis/mL)
V_1	-1,4	0	28	1,3
V_2	+1,4	0	112	1,3
V_3	0	-1,4	70	0,2
V_4	0	+1,4	70	2,6

As cinéticas de crescimento celular e secreção de anticorpo monoclonal, dos ensaios V_1 , V_2 e V_3 realizados, são apresentadas na Figura 4.8.

A cinética de crescimento celular e secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA do ensaio V_1 mostrou que o emprego da velocidade de agitação de 28rpm não favoreceu o crescimento celular e que os anticorpos foram produzidos a uma taxa específica de 7,8 pg/célula*dia até o segundo dia de cultivo, quando a concentração de 12 μ g/mL foi atingida.

No ensaio V_2 , onde foi empregada velocidade de agitação de 112rpm, foi observado que o crescimento celular ocorreu até o terceiro dia de cultivo, quando a concentração máxima de $1,0 \times 10^6$ células viáveis/mL foi alcançada. Nos dois primeiros dias de cultivo, a produção de anticorpo monoclonal ocorreu a uma taxa específica de 2,0pg/células*dia, sendo atingida concentração de 23 μ g/mL no segundo dia. A produção de anticorpo se estendeu até o quarto dia de cultivo quando uma concentração de 40 μ g/mL foi obtida, conforme mostrado na Figura 4.8.

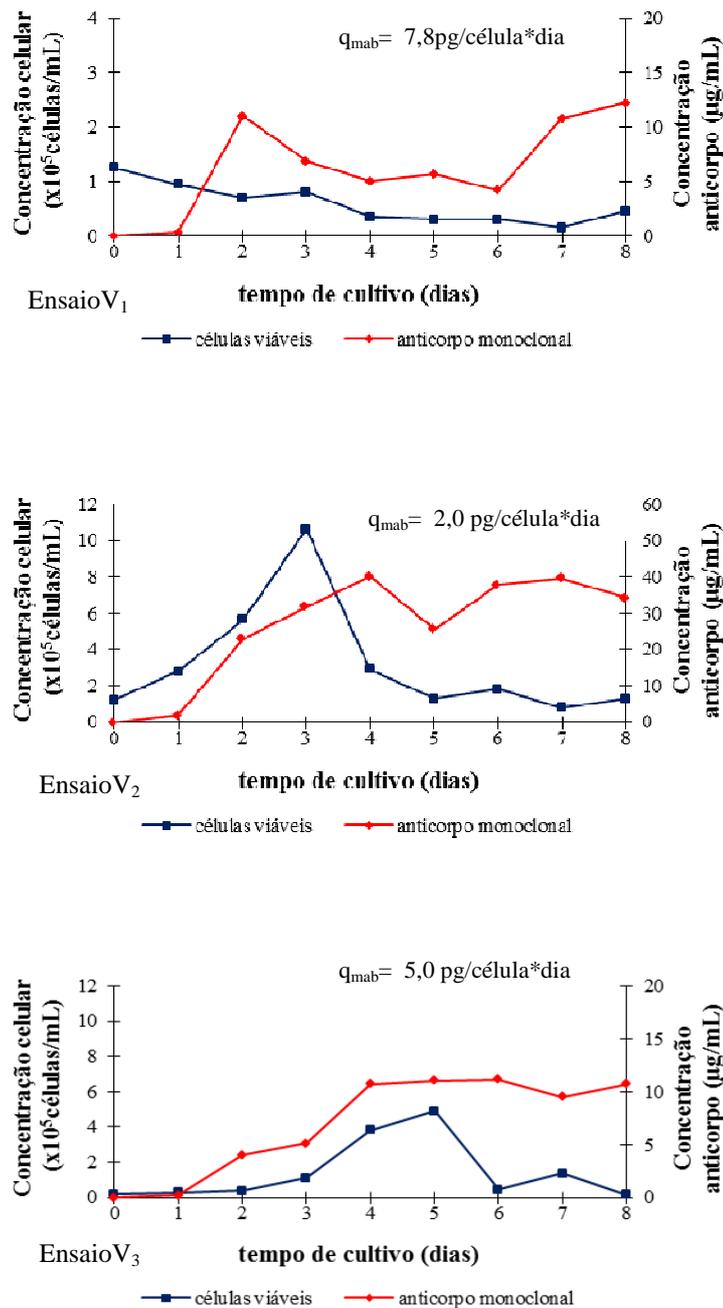


Figura 4.8: Crescimento celular e concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA de cinéticas celulares referentes aos ensaios utilizados no processo de validação do modelo matemático. (Ensaio V₁) concentração do inóculo celular inicial de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 28rpm; (Ensaio V₂) concentração do inóculo celular inicial de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 112rpm e (Ensaio V₃) concentração do inóculo celular inicial de $0,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e velocidade de agitação de 70rpm.

Na cinética de crescimento celular e produção de anticorpo monoclonal do ensaio V₃ apresentados na Figura 4.8, observou-se um período de adaptação celular de dois dias seguido de uma fase exponencial de crescimento celular até o quinto dia, quando a concentração máxima de $4,9 \times 10^5$ células viáveis/mL foi atingida. A secreção de anticorpo monoclonal nos

dois primeiros dias de cultivo ocorreu a uma taxa específica de 5,0pg/célula*dia, sendo atingida uma concentração de 4µg/mL ao fim do segundo dia. A concentração máxima de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de 10µg/mL foi atingida no quarto dia de cultivo e manteve-se aproximadamente constante até o oitavo e último dia, conforme mostrado na Figura 4.8.

A concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA ao final do segundo dia de cultivo e a taxa específica de produção do anticorpo monoclonal avaliada ao longo dos dois primeiros dias cultivo dos ensaios V_1 , V_2 e V_3 são mostrados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Concentração de anticorpo monoclonal (C_{mab}) ao fim do segundo dia de cultivo e a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (q_{mab}) dos ensaios realizados no processo de validação.

Ensaio	C_{mab} (µg/mL)	q_{mab} (pg/célula*dia)	
		dia 1	dia 2
V_1	11	0,3	7,8
V_2	23	0,7	2,0
V_3	4	0,7	5,0

A validade dos modelos matemáticos propostos para prever a determinação da concentração de anticorpo monoclonal e a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi verificada através do percentual de diferença entre os valores experimentais e propostos pelo modelo matemático desenvolvido, sendo o valor dos erros mostrados na Tabela 4.13 e 4.14, respectivamente.

Tabela 4.13: Valores experimentais e preditos pelo modelo proposto para concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (C_{mab}) ao fim segundo dia de cultivo dos ensaios utilizados no processo de validação do modelo matemático.

Ensaio	C_{mab} (µg/mL)	C_{mab} (µg/mL)	Erro (%)
	experimental	predito	
V_1	11	6	45
V_2	23	22	4
V_3	4	10	-150

Tabela 4.14: Valores experimentais e preditos pelo modelo proposto para taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (q_{mab}) dos ensaios utilizados no processo de validação do modelo matemático.

Ensaio	dia 1			dia 2		
	q_{mab}	q_{mab}	Erro	q_{mab}	q_{mab}	Erro
	experimental	predito	(%)	experimental	predito	(%)
V ₁	0,3	0,7	145	7,8	3,0	62
V ₂	0,7	1,3	81	2,0	1,5	28
V ₃	0,7	1,3	81	5,0	2,1	58

O ensaio V₁ mantido até o segundo dia de cultivo é a condição experimental que mais se aproxima da melhor condição proposta pelo modelo matemático, o qual propõe que maiores taxas de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA são observadas em cultivo realizado a baixas velocidades de agitação e mantidos até o segundo dia de cultivo. O erro de 4% do ensaio V₂ confirma que o modelo desenvolvido é adequado para prever a concentração de anticorpo monoclonal em sobrenadantes de cultivo de hibridomas realizado em frasco tipo *spinner* de eixo fixo de agitação.

Os menores erros relativos observados nos ensaios realizados até o segundo dia de cultivo corroboram com a proposta do modelo matemático elaborado de que a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA é favorecida em cultivos mantidos até o segundo dia. No entanto, o erro de 62% entre a taxa específica de produção de anticorpo experimental e predita no segundo dia do ensaio V₁ indica que o modelo matemático não é bom o suficiente para prever a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal quando baixas velocidades de agitação são utilizadas. O erro relativo observado no ensaio V₁ indica que o modelo apresentou tendência de comportamento não linear, cuja comprovação poderia ser realizada pela realização de um Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR). Com a utilização de um planejamento experimental que permita identificar efeitos quadráticos pode ser possível obter um modelo que descreva melhor o processo, assim como investigar outras condições para maximizar a produção de anticorpo e produtividade específica. Entretanto, com os resultados obtidos neste trabalho foi possível atingir uma q_{mab} em torno de 8,0pg/célula*dia com 28rpm de agitação e com concentração de inóculo celular inicial de $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL em dois dias de cultivo, valor este 2,5 vezes maior que os mais altos valores de q_{mab} obtidos no planejamento original, entre 3,0-3,3 (pg/célula*dia), conforme mostrado na Tabela 4.12. O emprego de uma menor concentração de inóculo celular pode ser importante sob o ponto de vista econômico do bioprocessamento, assim com o uso de menores agitações.

5. DISCUSSÃO

Staphylococcus spp. resistentes à Meticilina é um dos agentes infecciosos resistentes a antibióticos mais disseminados no mundo (Grundmann et al. 2006), causador de aproximadamente 28% das infecções em unidades de terapia intensiva no Brasil e, aproximadamente 19.000 óbitos/ano somente nos Estados Unidos (Anvisa 2009). A utilização de anticorpos monoclonais tem sido proposta como alternativa ao uso de antibióticos e como ferramenta diagnóstica do agente infeccioso (Fernebro 2011).

Células de hibridoma secretoras de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA foram cultivadas em frasco tipo *spinner* com eixo fixo de agitação a fim de que se pudesse avaliar seu crescimento celular e capacidade de secreção de anticorpo monoclonal em sistema agitado de cultivo, os quais podem oferecer condições mais homogêneas de cultivo, e permitir a obtenção de maior concentração de produto de interesse em função da possibilidade do emprego de maiores volumes de trabalho (Griffiths 2000).

Durante a realização dos cultivos celulares, os ensaios 1 e 3 foram interrompidos no segundo dia de cultivo devido a problemas de funcionamento da placa magnética agitadora e não puderam ser posteriormente repetidos por motivo de mudança, por parte do fabricante, na característica da insulina utilizada na suplementação do meio de cultivo. A insulina de origem bovina difere da insulina recombinante humana em três resíduos de aminoácidos, interferindo na sensibilidade dos cultivos celulares (Gemini Bio-Products 2012). Apesar dos problemas encontrados, os resultados apresentados possibilitaram verificar que o emprego de baixa velocidade de agitação não favoreceu o crescimento celular nem a secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, sendo que maiores taxas de produção de anticorpo foram observadas nos cultivos realizados a 40rpm, conforme mostrado nos ensaios 1 e 3.

A limitação de glicose mostrou ser o principal fator relacionado ao fim da fase exponencial de crescimento celular uma vez que foi identificada sua completa exaustão no cultivo celular a partir do terceiro dia, conforme mostrado no ensaio do ponto central apresentado na Figura 4.1A. A concentração máxima de lactato observada de 0,53g/L não atingiu valores considerados tóxicos, sendo que uma diminuição na concentração de lactato nos cultivos celulares ocorreu a partir do momento que a concentração de glicose ficou

abaixo de 0,2g/L, conforme mostrado nos ensaios 2, 4 e do ponto central; indicando que o lactato passou a ser consumido pelas células de hibridoma (Reuveny et al.1986).

A limitação de nutrientes e acúmulo de metabólitos são os principais fatores que interrompem a fase exponencial de crescimento celular, sendo que concentrações de lactato superiores a 3g/L são descritas como inibitórias para o crescimento celular por também interferir no aumento da osmolaridade do meio de cultivo (Legazpi et al. 2005).

Maior concentração celular foi obtida nos ensaios 2 e 4 em que o emprego de maiores velocidades de agitação podem ter favorecido o transporte de nutrientes e oxigênio para o interior das células (Legazpi et al. 2005). Dos ensaios propostos pelo planejamento fatorial completo 2^2 , a concentração celular máxima foi de $5,7 \times 10^5$ células viáveis/mL no oitavo dia de cultivo realizado a 100rpm, conforme mostrado no ensaio 4 da Figura 4.5.

Nos cultivos celulares realizados em frasco tipo *spinner* com hibridoma secretor de anticorpo antieritrocitário humano, em que a limitação de nutrientes não foi fator limitante ao crescimento celular, concentrações máximas de 1,3 a $2,3 \times 10^6$ células viáveis/mL foram encontradas, indicando que maiores concentrações de células de hibridomas secretoras de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA podem ser atingidas ao se utilizar meios de cultivo mais enriquecidos (Ferreira 2007).

Considerando que com o aumento da concentração de células viáveis a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo é reduzida, acredita-se que a ausência de crescimento celular no ensaio 3, realizado com uma concentração de inóculo celular inicial de $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL e agitação de 40rpm, tenha sido consequência da insuficiente concentração de oxigênio transferido para o meio de cultivo ou da formação de gradiente de concentração de oxigênio, que costuma ocorrer quando velocidades de agitação inferiores a 60rpm são utilizadas (Vallejos et al. 2011).

Nas cinéticas celulares do ensaio 3, o sofrimento das células de hibridomas secretoras do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA por possível limitação na aeração dos cultivos e fornecimento insuficiente de oxigênio para as células, pode ser indicado através da diminuição na concentração celular em 50% nos dois primeiros dias de cultivo, conforme mostrado na Figura 4.4. No caso do ensaio 1, esse sofrimento pode não ter sido evidenciado por causa da utilização de menor concentração do inóculo celular inicial de $0,6 \times 10^5$ células viáveis/mL, que corresponde a concentração de inóculo celular inicial de 3,6 vezes menor que a concentração celular inicial utilizado no ensaio 3, que foi de $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL.

A produtividade específica de anticorpo manteve-se constante desde o primeiro dia de cultivo até um dia após o término da fase exponencial de crescimento celular, indicando que a

taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA não foi diretamente associada ao crescimento das células de hibridomas.

O aumento da produtividade específica de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, observada nos ensaios 1 e 3 do planejamento fatorial completo 2² e no ensaio adicional V₁, realizados com baixas velocidades de agitação (40rpm e 28rpm, respectivamente) pode ser atribuído a uma condição estressante de diminuição de oferta de oxigênio. As baixas velocidades de agitação que possivelmente inibiram o crescimento celular, não contribuíram para um aumento da concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA no decorrer do cultivo, porém as produtividades específicas de anticorpo nos ensaios 1, 3 e V₁ foram favorecidas.

Considerando produtividade específica anticorpo monoclonal de 1,7 pg/células*dia no ensaio do ponto central com concentração do inóculo celular inicial de 1,3x10⁵ células viáveis/mL e a taxa específica de produção de anticorpo de 5,0pg/células*dia no ensaio V₃ com concentração do inóculo celular inicial de 0,2x10⁵ células viáveis/mL, em que ambos os cultivos foram realizados a 70rpm, foi observado um aumento de 2,9 vezes na taxa específica de produção de anticorpo monoclonal. Como a concentração do inóculo celular inicial de 0,2x10⁵ células viáveis/mL no ensaio V₃ é aproximadamente 10 vezes menor que a concentração do inóculo celular inicial de 2,2x10⁵ células viáveis/mL no ensaio do ponto central, uma maior fase *lag* no ensaio V₃ pode estar relacionada de modo favorável com o aumento da produtividade específica de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA (Suzuki et al. 1989).

Durante o ciclo celular, uma maior taxa específica de produção de anticorpo pode ser observada durante a fase G1, importante fase do ciclo celular para a síntese proteica; sendo que manter cultivos celulares de hibridomas em fase G1 do ciclo celular por um maior período de tempo pode aumentar a produtividade específica de anticorpos secretados (Suzuki et al. 1989, Jang & Barford 2000).

Com o aumento da demanda por anticorpos monoclonais, diversas estratégias de bioprocessamento de cultivos celulares têm sido adotadas para aumentar a taxa específica de produção de anticorpos e conseqüentemente aumentarem as concentrações de anticorpos monoclonais secretados (Chen et al. 2012).

Com o aumento de aproximadamente 50% na taxa específica de produção de anticorpos monoclonais dos cultivos celulares de hibridomas realizados a 40rpm (ensaio 1 e 3) em comparação aos ensaios realizados a 100rpm (ensaio 2 e 4), um aumento, não ocorrido, na concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA no sobrenadante celular ao final do segundo dia de cultivo era esperado, indicando que pode não existir correlação entre

a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal e a concentração de anticorpo nos sobrenadantes analisados ao final do segundo dia de cultivo (Chen et al. 2012).

Avaliando os fatores que apresentaram influência significativa sobre a concentração de anticorpo ao fim do segundo dia de cultivo, (velocidade de agitação, concentração do inóculo celular inicial e interação velocidade de agitação*concentração inóculo celular inicial), com os fatores que apresentaram influência significativa sobre a taxa específica de produção de anticorpo, (tempo de cultivo e interação tempo de cultivo*velocidade de agitação), foi verificado que as variáveis que exerceram influência sobre as duas respostas não coincidiram, indicando que não existe correlação entre a concentração de anticorpo monoclonal e sua taxa específica de produção ao fim do segundo dia de cultivo (Voigt & Zintl 1999).

A utilização de maior concentração do inóculo celular inicial pode favorecer a secreção de fatores de crescimento autócrinos celulares quando associado ao emprego de maiores velocidades de agitação que proporcionam uma melhor homogeneização de gases e de nutrientes no sistema de cultivo, podendo proporcionar condições mais adequadas ao crescimento celular, resultando em possíveis aumentos das concentrações de células viáveis e anticorpos monoclonais secretados nos sobrenadantes de cultivo.

Conforme proposto pelo modelo matemático apresentado, maiores concentrações de anticorpo foram obtidos em cultivos que empregaram maiores concentrações de inóculo celular inicial ($2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL) e maiores velocidades de agitação (100rpm). Verifica-se a partir dos resultados do ensaio V₂, empregado para validar os modelos matemáticos desenvolvido, que a concentração celular inicial apresentou menor influência sobre a concentração de anticorpo monoclonal ao fim do segundo dia de cultivo e que uma redução na concentração do inóculo celular inicial de $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL (ensaio 4) para $1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL (ensaio V₂) não promoveu uma diminuição significativa na concentração do anticorpo de interesse ao final do segundo dia de cultivo.

A literatura relata que o aumento da concentração celular e a concentração de anticorpo monoclonal não ocorrem de forma linear, sendo que um aumento de aproximadamente 10 vezes na concentração do inóculo celular inicial pode ser necessário para dobrar a concentração final de anticorpo em cultivos realizados em frasco tipo *spinner* (Lee et al. 1989).

No entanto, ao considerar uma cinética celular por oito dias, pode ser observado que a secreção de anticorpo monoclonal foi mantida até um dia após o término da fase exponencial de crescimento celular e que sua concentração manteve-se aproximadamente constante até o último dia de cultivo (oitavo dia de cultivo), indicando que a degradação do anticorpo

monoclonal anti-PBP2a de MRSA não foi favorecida pelas condições experimentais utilizadas. Para confirmar essa hipótese, no entanto, ensaios adicionais devem ser realizados.

Com a utilização de menor concentração do inóculo celular inicial foi observado que o consumo de glicose, e a síntese de anticorpo monoclonal ocorreram de forma mais lenta, favorecendo um prolongamento da fase exponencial de crescimento celular, conforme mostrado na Figura 4.3. A diminuição de 3,7 vezes na concentração do inóculo celular inicial verificada entre os ensaios 2 e 4 implicou em uma redução significativa de 16% na concentração de anticorpo monoclonal ao fim do oitavo dia de cultivo.

A concentração do inóculo celular inicial utilizada nos cultivos de células de hibridomas secretores do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA em frasco tipo *spinner* de eixo fixo de agitação pode ser reduzida, desde que seja considerada a concentração secretada de anticorpo monoclonal, a qualidade e a atividade biológica do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, haja vista que a diminuição na concentração do inóculo celular inicial pode impactar significativamente na redução de custos com materiais e tempo operacional, considerando principalmente a produção em grande escala de anticorpos monoclonais anti-PBP2a de MRSA em cultivos celulares de hibridomas em biorreatores.

Sistemas que apresentam maior produtividade específica costumam ser favorecer a obtenção de maior concentração de produto proteico de interesse por volume (produtividade volumétrica). No entanto, de acordo com os resultados obtidos, os ensaios realizados empregando baixa velocidade de agitação e baixa concentração do inóculo celular inicial, que se mostraram favoráveis a um aumento de q_{mab} , resultaram em uma menor produtividade volumétrica, possivelmente provocada pela redução do número de células viáveis quando comparado as condição experimental que empregou maiores velocidade de agitação e maior concentração do inóculo celular inicial.

Dentre os resultados apresentados, as condições que utilizaram alta ou média concentração do inóculo celular inicial ($1,3$ ou $2,2 \times 10^5$ células viáveis/mL) e maiores velocidades de agitação (100rpm) foram as condições experimentais mais favoráveis à obtenção do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA em frasco tipo *spinner*. A utilização de baixas velocidades de agitação e/ou baixas concentrações de inóculo celular inicial apesar de se apresentarem como fatores que favoreceram o aumento da produtividade específica, não mostraram-se apropriadas para obtenção de anticorpo monoclonal em cultivos de células de hibridoma realizados em frasco tipo *spinner*, uma vez que para obter concentrações significativas de anticorpo monoclonal nessas condições experimentais, seria necessário a utilização de maior volume de meio de cultivo resultando em um aumento de gastos com material.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Dentro das condições em que foram realizados os experimentos e estudos mostrados, no presente trabalho, foi concluído que:

- 1) A utilização de frasco tipo *spinner* de eixo fixo de agitação foi adequada para o cultivo de células de hibridomas murinos secretoras do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA utilizando meio DMEM com 10% (v/v) de SFB;
- 2) Foi possível determinar as concentrações de anticorpos monoclonais anti-PBP2a de MRSA secretados pelas células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3, por Imunoensaio Enzimático (ELISA);
- 3) As diferentes concentrações de anticorpos monoclonais anti-PBP2a de MRSA, em cultivos de células de hibridomas, clone 90/DA5/CB5/AA3, sugerem padrões distintos de secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA em cultivos realizados com diferentes passagens;
- 4) A partir do terceiro dia da cinética celular, a glicose foi completamente consumida indicando que os cultivos das células de hibridomas murinos, clone 90/DA5/CB5/AA3, podem ter sofrido limitação no crescimento celular bem como na obtenção de maiores concentrações de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA;
- 5) A concentração máxima de lactato observado nos cultivos celulares de 0,59g/L, no segundo dia de cultivo, indica não prejudicar o crescimento celular e a secreção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, conforme mostrado na Figura 4.4B;
- 6) A velocidade de agitação, dentre as variáveis estudadas no planejamento fatorial completo foi, dentre as variáveis estudadas, a que apresentou influência significativa no segundo dia de cultivo sobre a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA obtida, a concentração celular máxima atingida nas cinéticas celulares e a taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA;
- 7) A concentração celular máxima e a concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA apresentaram uma tendência de aumento com a elevação da concentração do inóculo celular inicial e da velocidade de agitação;

- 8) A taxa específica de produção de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA apresentou uma tendência de aumento com a redução da concentração do inóculo celular inicial e da velocidade de agitação;
- 9) O modelo matemático linear proposto pelo planejamento fatorial completo para duas variáveis (2^2) foi adequado para representar os cultivos celulares realizados em função da concentração de anticorpo monoclonal obtida; e
- 10) A utilização de concentração do inóculo celular inicial 35% menor ($1,3 \times 10^5$ células viáveis/mL) que o utilizado normalmente ($2,0 \times 10^5$ células viáveis/mL) quando associada a velocidades de agitação de 112rpm indica não interferir na concentração de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA total obtida, nos cultivos mantidos até o segundo dia, conforme mostrado nas Figuras 4.5 e 4.8.

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

- ✓ Realização de ensaios adicionais a fim de identificar os efeitos quadráticos que permitam desenvolver um modelo que melhor descreva o processo.
- ✓ Estudar a condição de cultivo utilizando meios mais enriquecidos como, por exemplo, meio livre de soro fetal bovino e meio com maior concentração de glicose, que podem, além de proporcionar maiores concentrações de anticorpo monoclonal, facilitar o processo de purificação.
- ✓ Realizar ensaios de caracterização proteica, com a finalidade de determinar a funcionalidade do anticorpo monoclonal secretado nas condições de cultivo utilizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anvisa - Ministério da Saúde. **Boletim informativo da rede nacional de monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde- Rede RM** - [online]. Brasil; 2007. [capturado 01 nov. 2012] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm

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

Acosta M, Sánchez A, García F, Contreras A, Molina E. **Analysis of kinetic, stoichiometry and regulation of glucose and glutamine metabolism in hybridoma batch cultures using logistic equations**. Cytotechnology 2007;54(3):189-200.

Altamirano C, Godia F, Cairó JJ. **Metabolismo de células de mamíferos cultivados *in vitro***. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LP, editores. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. 1ªed. São Paulo: Roca; 2008. p. 81-100.

Alves PMM, Teixeira MJ, Cruz PE. **Introdução à tecnologia de cultivo de células animais**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LP, editores. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. 1ªed. São Paulo: Roca; 2008. p.1-12

Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ªed. Campinas: Unicamp; 1995.

Benjouad A. **Antibody biotechnology**. Afr. J. Biotechnol 2009; 8(13):2911-5.

Boucher HW, Corey GR. **Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***. Clin Infect Dis. 2007; 46(5): 344-49.

Brun-Graeppi AKAS, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten O-W. **Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers**. Journal of Controlled Release 2011; 149(3):209-24.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. **A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure**. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(6): 1211-33.

Butler M, Huzel N, Barnabé N, Gray T, Bajno L. **Linoleic acid improves the robustness of cells in agitated cultures**. Cytotechnology 1999; 30(1):27-36.

Casadevall A, Pirofski L. **New concepts in antibody-mediated immunity**. Infect Immun 2004; 72(11):6191-6.

Cavalcanti SMM, França ER, Vilela MA, Montenegro F, Cabral C, Medeiros ACR. **Comparative study on the prevalence of *Staphylococcus aureus* imported to intensive care units of a university hospital, Pernambuco, Brazil.** Rev Bras de Epidemiol 2006; 9:436-46.

Chakhtoura M, Abdelnoor AM. **Monoclonal antibodies used as prophylactic, therapeutic and diagnostic agents.** Immunopharmacol Immunotoxicol 2010; 32(4):533-42.

Chartrain M, Chu L. **Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies.** Curr Pharm Biotechnol 2008; 9(6):447-67.

Chartrain M, Chu L. **Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies.** Current Pharmaceutical Biotechnology 2008; 9:447-67.

Chen F, Ye Z, Zhao L, Liu X, Fan L, Tan W-S. **Correlation of antibody production rate with glucose and lactate metabolism in Chinese hamster ovary cells.** Biotechnology Letters 2012;34(3):425-32.

Chiarella P, Fazio VM. **Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production.** Biotechnol Lett 2008; 30(8):1303-10.

Chico E, Rodríguez G, Figueredo A. **Biorreatores para células animais.** In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LP, editores. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica.** 1ªed. São Paulo: Roca; 2008. p. 216-51.

Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. **Projeto farmácia estabelecimento de saúde: antibióticos.** São Paulo: Conselho Regional de Farmácia; 2011.

Deshpande RR, Heinzle EE. **Online monitoring of oxygen in spinner flasks.** Biotechnol Lett 2009; 31:665-9.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. **The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2006; 13: 222-35.

Didier D, Etcheverrigaray M, Kratje R. **Crossed mixture design and multiple response analysis for developing complex culture media used in recombinant protein production.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 2007; 86:1-9.

Doyle A, Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** 1ªed. New York: Wiley; 1999.

Dutton RL, Scharer JM, Moo-Young M. **Hybridoma growth and productivity: effects of conditioned medium and of inoculum size.** Cytotechnology 1999;29(1):1-10.

Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. **Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations.** Trends in Biotechnology 2006; 24(3):105-8.

Ferreira D. **Caracterização metabólica e cinética do cultivo de três hibridomas para produção de imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários para uso hemoterápico.** [dissertação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2007.

Fernebro J. **Fighting bacterial infections: future treatment options.** Drug Resistance Updates 2011; 14(2):125-39.

Franco R, Daniela G, Fabrizio M, Ilaria G, Detlev H. **Influence of osmolarity and pH increase to achieve a reduction of monoclonal antibodies aggregates in a production process.** Cytotechnology 1999; 29(1):11-25.

Freshney RI. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** Wiley-Liss; 1994.

Gemini Bio-Products. **Insulin: Pig? Bovine? Human? What am I supposed to be using?** [capturado 10 nov. 2012] Disponível em: <http://www.gembio.com/blog-entry/gemblog-insulin-pig-bovine-human-what-am-i-supposed-be-using>

Godoy-Silva R, Chalmers JJ, Casnocha SA, Bass LA, Ma N. **Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress.** Biotechnology and Bioengineering 2009;103(6):1103-17.

Graveland H, Duim B, van Duijkeren E, Heederik D, Wagenaar JA. **Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans.** Int J Med Microbiol 2011; 301(8):630-4.

Griffiths JB. **Scaling-up of animal cell cultures.** In: Masters JRW, editor. **Animal cell culture.** 3^{ed}. New York: Oxford University; 2000. p.19-68.

Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. **Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat.** The Lancet 2006; 368(9538):874-85.

Heidemann R, Riese U, Lütkemeyer D, Büntemeyer H, Lehmann J. **The Super-Spinner: A low cost animal cell culture bioreactor for the CO₂ incubator.** Cytotechnology 1994;14(1):1-9.

Hendriksen CFM, de Leeuw W. **Production of monoclonal antibodies by the ascites method in laboratory animals.** Res Immunol 1998; 149(6):535-42.

Jain E, Kumar A. **Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters.** Biotechnology Advances 2008; 26(1):46-72.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. **Imunobiologia – O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença.** 5^a ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda; 2002.

Jang JD, Barford JP. **Effect of feed rate on growth rate and antibody production in the fed-batch culture of murine hybridoma cells.** Cytotechnology 2000; 32: 229-42.

Jemili-Ben Jomaa M, Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Redjeb S. **Identification of staphylococcal cassette chromosome mec encoding methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates at Charles Nicolle Hospital of Tunis.** Pathologie Biologie 2006; 54(8-9):453-5.

King JA, Miller WM. **Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation.** Current Opinion in Chemical Biology 2007; 11(4):394-8.

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.

Korn GP, Martino MDV, Mimica IM, Mimica LJ, Chiavone PA, Musolino LRS. **High frequency of colonization and absence of identifiable risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intensive care units in Brazil.** Braz J Infect Dis 2001; 5:1-7.

Larentis AL, Nicolau JFMQ, Argondizzo ANC, Galler R, Rodrigues MI, Medeiros MA. **Optimization of medium formulation and seed conditions for expression of mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) in *Escherichia coli* using a sequential experimental design strategy and response surface methodology.** J Ind Microbiol Biotechnol 2012; 39:897-908.

Lee GM, Varma A, Palsson BO. **Application of Population Balance Model to the Loss of Hybridoma Antibody Productivity.** Biotechnology Progress 1991;7(1):72-5.

Legazpi L, Díaz J, Laca A, Díaz M. **Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: Substrate and agitation effects.** Biochemical Engineering Journal 2005; 26(2-3):122-30.

Legazpi L, Laca A, Díaz M. **Kinetic analysis of hybridoma cells viability under mechanical shear stress with and without serum protection.** Bioprocess and Biosystems Engineering 2009;32(6):717-22.

Marini G. **Avaliação por planejamento de experimentos dos efeitos da composição do meio de cultura e das variáveis de indução na expressão de pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli*.** [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2011.

Marques CH. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica.** [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2005.

McCarthy NL, Sullivan PS, Gaynes R, Rimland D. **Health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A comparison of definitions.** Am J Infect Control 2010; 38(8):600-6.

Mejía C, Zurita J, Blanco MG. **Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America.** Braz J Infect Dis 2010;14 (Suppl 2):S79-S86.

Montgomery. **Diseño y análisis de experimentos.** 1 ed. Mexico: Grupo Editorial Iberoamérica; 1991.

Mororó JS. **Estudo de marcação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a com ^{99m}Tc .** [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.

Mulukutla BC, Gramer M, Hu W-S. **On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells.** Metabolic Engineering 2012; 14(2):138-49.

Nikel PI, Pettinari MJ, Méndez BS et al. **Statistical optimization of cultura medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant agroindustrial byproducts.** International Microbiology 2005; 8:243-50.

Nilsang S, Nehru V, Plieva FM, Nandakumar KS, Rakshit SK, Holmdahl R, et al. **Three-dimensional culture for monoclonal antibody production by hybridoma cells immobilized in macroporous gel particles.** Biotechnology Progress 2008;24(5):1122-31.

Ogawa T, Kamihira M, Yoshida H, Iijima S, Kobayashi T. **Effect of dissolved oxygen concentration on monoclonal antibody production in hybridoma cell cultures.** Journal of Fermentation and Bioengineering 1992;74(6):372-8.

Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL et al. **Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin.** Infect Control Hosp Epidemiol 2001; 22(7):443-8.

Otter JA, French GL. **Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection.** Journal of Hospital Infection 2011; 79:189-93.

Ozturk SS, Palsson BØ. **Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production.** Journal of Biotechnology 1990; 16(3-4):259-78.

Ozturk SS, Palsson BO. **Examination of serum and bovine serum albumin as shear protective agents in agitated cultures of hybridoma cells.** Journal of Biotechnology 1991; 18(1-2):13-28.

Pucca MB, Bertolini TB, Barbosa JE, Ribeiro Galina SV, Porto GS. **Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals.** Braz J Pharm Sci 2011; 47(1):31-9.

Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. **Monoclonal antibody successes in the clinic.** Nature Biotechnology 2005;23(9):1073.

Reuveny S, Velez D, Macmillan JD, Miller L. **Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors.** Journal of Immunological Methods 1986; 86(1):53-9.

Ribeiro J, Boyce JM, Zancanaro PQ. **Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Among Patients Visiting the Emergency Room at a Tertiary Hospital in Brazil.** Braz J Infect Dis 2005; 9:52-5.

Rodrigues, Iemma. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos.** 2ed. São Paulo: Editora Casa do Pão; 2009.

Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. **Technological progresses in monoclonal antibody production systems.** Biotechnology Progress 2010;26(2):332-51.

Roth DM, Senna JPM and Machado DC. **Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Genet Mol Res 2006; 5(3): 503-12.

Santos HB, Machado DP, Camey AS,, Kuchenbecker RS, Barth AL, Wagner MB. **Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil.** Infectious Diseases 2010; 10:328.

Schneider M, Marison IW, von Stockar U. **The importance of ammonia in mammalian cell culture.** Journal of Biotechnology 1996; 46(3):161-85.

Selvarasu S, Wong VVT, Karimi IA, Lee D-Y. **Elucidation of metabolism in hybridoma cells grown in fed-batch culture by genome-scale modeling.** Biotechnology and Bioengineering 2008;102(5):1494-504.

Senna JP., Roth DM, Oliveira JS, Machado DC, Santos DS. **Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach.** Vaccine 2003; 21(19–20):2661-6.

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

Shukla AA, Thömmes J. **Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins.** Trends in Biotechnology 2010; 28(5):253-61.

Shuler ML , Kargi F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts.** Prentice Hall, 1992.

Stapleton PD, Taylor PW. **Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation.** Sci Prog 2002; 85(1): 57–72.

Suzuki E, Ollis DF. **Cell cycle model for antibody production kinetics.** Biotechnol Bioeng 1989; 34: 1398-1402.

Tang Y-J, Li H-M, Hamel J-F. **Effects of dissolved oxygen tension and agitation rate on the production of heat-shock protein glycoprotein 96 by MethA tumor cell suspension culture in stirred-tank bioreactors.** Bioprocess and Biosystems Engineering 2009;32(4):475-84.

Tanzeglock T, Soos M, Stephanopoulos G, Morbidelli M. **Induction of mammalian cell death by simple shear and extensional flows.** Biotechnology and Bioengineering 2009;104(2):360-70.

Trebak M, Chong JM, Herlyn D, Speicher DW. **Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology.** J. Immunol. Methods 1999; 230(1-2):59-70.

Vallejos JR, Brorson KA, Moreira AR, Rao G. **Dissolved oxygen and pH profile evolution after cryovial thaw and repeated cell passaging in a T-75 flask.** Biotechnology and Bioengineering 2010;105(6):1040-7.

Vázquez-Rey M, Lang DA. **Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes.** Biotechnology and Bioengineering 2011; 108(7):1494-1508.

Verkaik NJ, Wamel WJB, Belkum A. **Immunotherapeutic approaches against *Staphylococcus aureus*.** Immunotherapy 2011; 3(9):1063-1073.

Voigt A, Zintl F. **Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers.** Journal of Biotechnology 1999; 68(2-3):213-26.

Walsh G. **Biopharmaceutical approval trends in 2009: biotech approvals were up last year is it a sign of a new trend?** Biopharm Int 2010; 23(10): 30-41.

Walsh G. **A review of new biologic drug approvals over the years, featuring highlights from 2010 and 2011.** Biopharm Int 2012; 25(6):34-38.

Wilkins C, Altamirano C, Gerdtzen Z. **Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose.** Biotechnology and Bioengineering 2011;16(4):714-24.

Yeo JH, Lo JC, Nissom PM, Wong VV. **Glutamine or glucose starvation in hybridoma cultures induces death receptor and mitochondrial apoptotic pathways.** Biotechnology Letters 2006; 28(18):1445-52.

Yokoyama W. **Production of monoclonal antibodies: Induction of immune responses.** In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, editors. **Current Protocols in Immunology.** Hoboken: Wiley and Sons; 1995; 2.5.4-2.5.8.

Zanatta AS. **Obtenção de anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em diferentes meios e sistemas de cultivo.** [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.

Zecconi A, Hahn G. **Staphylococcus aureus in raw milk and human health risk.** Bulletin of the International Dairy Federation 2000; 345:15-18.

Zhong J-J. **Recent advances in bioreactor engineering.** Korean Journal of Chemical Engineering 2010; 27(4):1035-41.

8. ANEXOS

Tabela 8.1: Composição química do meio de cultivo DMEM.

Componentes	Concentração	
	mg/L	mM
Aminoácidos		
Glicina	30	0,4
L-arginina	84	0,398
L-cisteína	63	0,201
L-glutamina	584	4
L-histidina	42	0,2
L-isoleucina	105	0,802
L-leucina	105	0,802
L-lisina	146	0,798
L-metionina	30	0,201
L-fenilalanina	66	0,4
L-serina	42	0,4
L-treonina	95	0,798
L-triptofano	16	0,0784
L-tirosina	104	0,398
L-valina	94	0,803
Vitaminas		
Colina	4	0,0286
D-pantotenato de cálcio	4	839
Ácido fólico	4	907
Niacinamida	4	0,0328
Piridoxina	4	0,0196
Riboflavina	0,4	106
Tiamina	4	0,0119
Inositol	7,2	0,04
Sais inorgânicos		
Cloreto de cálcio	200	1,8
Nitrato férrico	0,1	248
Sulfato de magnésio	7,67	0,814
Cloreto de potássio	400	5,33
Cloreto de sódio	6400	10,34
Fosfato de sódio monobásico	125	0,906
Outros componentes		
D-glicose	1000	5,56
Vermelho de fenol	15	0,0399
Piruvato de sódio	110	1