

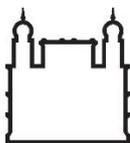
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**AVALIAÇÃO DE UMA BOMBA CENTRÍFUGA DE LEVITAÇÃO
MAGNÉTICA E SEU IMPACTO NO DESEMPENHO DO CULTIVO DE
CÉLULAS CHO**

MARINA VERGNE DE ALMEIDA

**Rio de Janeiro
2017**



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

MARINA VERGNE DE ALMEIDA

Avaliação de uma bomba centrífuga de levitação magnética e seu impacto no desempenho do cultivo de células CHO

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

Rio de Janeiro
2017

Trabalho realizado no Instituto de
Tecnologia de Imunobiológicos, no
Laboratório de Tecnologia Viroológica,
sob a orientação de Dr. Rodrigo
Coelho Ventura Pinto e Dra. Maíra
Peixoto Pellegrini

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

MARINA VERGNE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE UMA BOMBA CENTRÍFUGA DE LEVITAÇÃO
MAGNÉTICA E SEU IMPACTO NO DESEMPENHO DO CULTIVO DE
CÉLULAS CHO**

Orientadores: Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto
Dra. Maíra Peixoto Pellegrini

Dissertação aprovada em 13 de junho de 2017

Examinadores:

Dr. Alvio Figueredo Cardero
Fiocruz/ Presidente

Dr. Eduardo Ruback dos Santos
Fiocruz

Dr. Ricardo de Andrade Medronho
UFRJ

Rio de Janeiro
2017

Ao meu querido tio Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz por essa grande oportunidade de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos pelo apoio e autorização para realização deste trabalho.

À coordenação e aos professores do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, em especial à Zaíra Prado pelo carinho e atenção.

Aos meus orientadores Rodrigo Coelho Ventura Pinto e Máira Peixoto Pellegrini, pelo conhecimento compartilhado, confiança, paciência e principalmente pela amizade construída.

Ao Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), pela infraestrutura disponibilizada, em especial ao Gerson da Silva, ao Max Areas e ao Rafael dos Santos pelo suporte durante os experimentos.

Ao Dr. Álvaro Bertho e à Thaize Quiroga, da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio com os testes de citometria de fluxo e discussões enriquecedoras.

Ao Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) por disponibilizar o analisador bioquímico YSI 2700 e ao Alexandre Murad pela ajuda durante os testes.

À minha família, pelo suporte e incentivo em todos os momentos da minha vida, em especial ao meu pai Miguel Almeida, minha mãe Graça Vergne e minha irmã Mariana Almeida.

Ao Christian, meu pequeno companheiro, pela motivação diária e amor incondicional.

Aos meus avós, grandes exemplos e fontes de inspiração, pela torcida e amor.

Aos amigos do Projeto EPO, pelo apoio e compreensão, especialmente ao Tiago Santos e à Esther Gutierrez, por toda ajuda durante o trabalho.

Aos companheiros da turma MPTI 2015 Beatriz Kaippert, Eduardo Castro, Hugo Defendi, Isabelly Pereira, Larissa Duarte, Luciana Neves por tornarem a jornada mais leve e descontraída.

Aos queridos amigos Carolina Lindenberg, Jéssica Malheiros, Nathália da Costa e Vítor Fernandes, por dividirem as angústias e as conquistas desse momento e da vida.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez. ”

George Bernard Shaw

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE VARIÁVEIS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistemas de expressão de proteínas recombinantes.....	3
1.2. Sistemas de cultivo para células animais.....	4
1.3. Modos de operação de biorreatores.....	7
1.3.1. Dispositivos para retenção celular	9
1.3.2. Bombas para recirculação da suspensão celular.....	13
1.4. Estresse mecânico e fisiologia celular.....	14
1.5. Ensaio para monitoramento da morte celular.....	18
1.6. Citometria de fluxo	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo principal.....	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Meios de Cultivo e Soluções.....	23
3.2. Linhagem celular	24
3.3. Métodos Analíticos	26
3.4. Sistema de cultivo em biorreator com recirculação da suspensão celular.....	35
3.4.1. Montagem do circuito de recirculação com a bomba PuraLev® 200MU..	35
3.4.2. Calibração do circuito de recirculação com a bomba PuraLev® 200MU..	36
3.4.3. Montagem e esterilização do biorreator com circuito de recirculação	37
3.4.4. Teste do circuito de recirculação nas velocidades de 1000, 2000 e 3000 rpm.....	38

3.4.5. Operação contínua do circuito de recirculação	40
3.5. Sistema de cultivo em biorreator sem recirculação de suspensão celular.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Determinação das condições operacionais da bomba PuraLev® 200MU em uma linha de recirculação fechada	43
4.2. Avaliação dos efeitos da variação da velocidade da bomba sobre a fisiologia celular do cultivo	44
4.2.1. Operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm	50
4.2.2. Operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm	53
4.2.3. Operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm	57
4.3. Avaliação do impacto da operação contínua do circuito de recirculação.....	61
4.3.1. Teste de recirculação contínua I	64
4.3.2. Teste de recirculação contínua II.....	73
5. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 7-AAD – *7-aminoactinomycin D* (7-aminoactinomicina D)
CHO – *Chinese hamster ovary* (ovário de hamster chinês)
CIP – *Clean in place* (limpeza *in situ*)
DHFR- Diidrofolato redutase
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
DNase – *Deoxyribonuclease* (desoxirribonuclease)
ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
EPOhr – Eritropoetina humana recombinante
FITC – *Fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)
FSC – *Forward scatter* (dispersão frontal)
GS – Glutamina sintetase
HCP – *Host cell protein* (proteína da célula hospedeira)
IFA – Ingrediente farmacêutico ativo
LDH – *Lactate dehydrogenase* (lactato desidrogenase)
pb – Pares de base
PBS – *Phosphate-buffered saline* (tampão fosfato-salino)
PDP – Parcerias para Desenvolvimento Produtivo
PE – *Phycoerythrin* (ficoeritrina)
PI – *Propidium iodide* (iodeto de propídeo)
rcf – *Relative centrifugal force* (força centrífuga relativa)
RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RNase – Ribonuclease
rpm – Revolução por minuto
SSC – *Side scatter* (dispersão lateral)
SUS – Sistema Único de Saúde

LISTA DE VARIÁVEIS

X_v	- Concentração de células viáveis	($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)
X_m	- Concentração de células mortas	($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)
X_t	- Concentração de células totais	($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)
V	- Volume	(mL ou L)
t	- Tempo	(min ou h)
t_d	- Tempo de duplicação	(h)
Q_v	- Vazão volumétrica	($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)
μ	- Taxa específica de crescimento	(h^{-1})
μ_{ap}	- Taxa específica de crescimento aparente	(h^{-1})
$q_{[GLC]}$	- Taxa específica de consumo de glicose	($\text{mmol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
$q_{[LAC]}$	- Taxa específica de produção de lactato	($\text{mmol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
$q_{[EPOhr]}$	- Taxa específica de produção de EPOhr	($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
GLC	- Concentração de glicose	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
LAC	- Concentração de lactato	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$EPOhr$	- Concentração de EPOhr	($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
$Y_{[LAC]/[GLC]}$	- Fator de conversão de glicose em lactato	($\text{mmol}\cdot\text{mmol}^{-1}$)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Sistemas de cultivo em pequena escala.....	5
Figura 1.2. Tipos de biorreatores homogêneos.....	6
Figura 1.3. Esquema representando os diferentes modos de operação de biorreatores.	8
Figura 1.4. Dispositivos de retenção por sedimentação.	10
Figura 1.5. Esquema representativo e princípio de funcionamento de um hidrociclone.....	11
Figura 1.6. Esquema representativo da filtração tangencial.	11
Figura 1.7. Esquema representativo do filtro de malha rotativa.....	12
Figura 1.8. Esquema com as linhas de alimentação do dispositivo de retenção celular, reciclo e perfundido, em biorreator operado em perfusão.	13
Figura 1.9. Esquema representativo das fases do ciclo celular.	15
Figura 1.10. Esquema representativo de características morfológicas durante morte celular por necrose, apoptose e autofagia.....	17
Figura 3.1. Representação dos quadrantes do hemocítômetro	27
Figura 3.2. Esquema do sistema de recirculação celular.	35
Figura 3.3. Bomba centrífuga com impelidor magnético PuraLev® 200MU.	36
Figura 3.4. Esquema representativo do teste de calibração do circuito de recirculação.	37
Figura 3.5. Vista superior da tampa do vaso do biorreator	38
Figura 4. 1. Curva de calibração da bomba PuraLev® 200MU.....	44
Figura 4.2. Curva de crescimento e viabilidade celular da cinética em batelada no biorreator RALF Plus.	45
Figura 4.3. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo celular da cinética em batelada no biorreator RALF Plus.	47
Figura 4.4. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante a cinética em batelada no biorreator RALF Plus.	47
Figura 4.5. Concentração de EPOhr durante a cinética em batelada no biorreator RALF Plus.	48
Figura 4.6. Produtividade específica de EPOhr durante a cinética em batelada no biorreator RALF Plus.	49
Figura 4.7. Curva de crescimento e viabilidade celular do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.....	50
Figura 4.8. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.	52

Figura 4.9. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm	53
Figura 4.10. Curva de crescimento e viabilidade celular do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.	54
Figura 4.11. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.	56
Figura 4.12. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm.	57
Figura 4.13. Curva de crescimento e viabilidade celular do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.	58
Figura 4.14. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.	60
Figura 4.15. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm.	60
Figura 4.16. Comparação das curvas de crescimento e viabilidade celular das cinéticas controle em modo batelada e modo semi-contínuo.	62
Figura 4.17. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo da cinética controle em modo semi-contínuo.	63
Figura 4.18. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante a cinética controle em modo semi-contínuo.	64
Figura 4.19. Curva de crescimento e viabilidade celular do primeiro teste de recirculação contínua.	65
Figura 4.20. Comparação entre valores obtidos para concentração de glicose com os equipamentos Accu chek e YSI 2700.	68
Figura 4.21. Curva de concentração de glicose e de lactato durante o primeiro teste de recirculação contínua, obtidas com o equipamento YSI 2700.	69
Figura 4.22. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante o primeiro teste de recirculação contínua.	70
Figura 4.23. Concentração de HCP no sobrenadante celular durante o primeiro teste de recirculação contínua.	71
Figura 4.24. Concentração de EPOhr no sobrenadante celular durante o primeiro teste de recirculação contínua.	72

Figura 4.25. Produtividade específica de EPOhr durante o primeiro teste de recirculação contínua.....	73
Figura 4.26. Curva de crescimento e viabilidade celular do segundo teste de recirculação contínua.....	75
Figura 4.27. Curva de concentração de glicose e de lactato durante o segundo teste de recirculação contínua, obtidas com o equipamento YSI 2700.	77
Figura 4.28. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante o segundo teste de recirculação contínua.....	78
Figura 4.29. Concentração de HCP no sobrenadante celular durante o segundo teste de recirculação contínua.....	78
Figura 4.30. Concentração de EPOhr no sobrenadante celular durante o segundo teste de recirculação contínua.....	79
Figura 4.31. Produtividade específica de EPOhr durante o segundo teste de recirculação contínua.....	80
Figura 4.32. Estratégia de análise para exclusão de agregados no software CytExpert. Dot plot PI-A (área) versus PI-H (altura). Gate “singlets” – células únicas. Amostra: cultivo em frasco estacionário T25 marcado com iodeto de propídeo.....	82
Figura 4.33. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular (gate POP B) e os eventos associados à morte celular (gate POP A) ao longo do segundo teste de recirculação contínua.....	84
Figura 4.34. Comparação entre percentual de células mortas quantificadas com azul de tripano e eventos associados à morte celular na análise do ciclo celular por citometria de fluxo durante o segundo teste de recirculação contínua.....	85
Figura 4.35. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular (gate POP B) e os eventos associados à morte celular (gate POP A) ao longo de 10 dias de cultivo em batelada em frasco T25.....	86
Figura 4.36. Percentual de eventos associados à morte celular, durante análise do ciclo celular por citometria de fluxo, ao longo de 10 dias de cultivo de células CHO em frasco T25, em batelada.....	87
Figura 4.37. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular (gates G0/G1, S e G2/M) ao longo do segundo teste de recirculação contínua.....	88
Figura 4.38. Percentual de eventos nas populações G0/G1, S e G2/M ao longo do segundo teste de recirculação contínua.....	89
Figura 4.39. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular ao longo de 10 dias de cultivo em frasco T25. Gates representam as populações em G0/G1, S e G2/M.....	90

Figura 4.40. Percentual de eventos nas populações G0/G1, S e G2/M ao longo de 10 dias de cultivo em batelada em frascos T25.....	91
Figura 4.41. Dot plot side scatter (SSC) versus forward scatter (FSC) de cultivo controle de células CHO realizado em frasco T25.	92
Figura 4.42. (1A) Dot plot FSC versus PI de amostra não marcada. (1B) Histograma de fluorescência de PI de amostra não marcada. (2A) Dot plot FSC versus PI de amostra marcada com PI. (2B) Histograma de fluorescência de PI de amostra marcada com PI. Amostra: cultivo controle realizado em frasco T25.	93
Figura 4.43. (A) Dot plot FSC versus SSC de amostra marcada com PI, células em vermelho correspondem ao gate de células mortas (PI+), gate POP2 compreende população de células menores e mais complexas. (B) Dot plot FSC versus PI de amostra marcada com PI, gate de células mortas (PI+). Amostra: cultivo controle realizado em frasco T25.	94
Figura 4.44. Comparação entre percentuais de viabilidade celular obtidos pelas metodologias de microscopia utilizando azul de tripano, e as análises da morfologia em citometria de fluxo da morfologia, marcação com iodeto de propídeo e ciclo celular durante o segundo teste de recirculação contínua.....	95
Figura 4.45. Dot plot anexina-V/PE versus 7AAD com gates para células viáveis, células em apoptose inicial e para células em apoptose tardia e/ou necrose. Amostra: cultivo controle realizado em frasco T25 (A) Marcação simples com 7AAD. (B) Marcação simples com anexina-V/PE. (C) Marcação dupla anexina-V/PE e 7AAD.	96
Figura 4.46. Dot plot Anexina-V/PE versus 7AAD com gates para células viáveis, células em apoptose inicial e para células em apoptose tardia e/ou necrose. (A) Perfil observado após aquecimento a 80°C. (B) Perfil observado após incubação com cisplatina.	97
Figura 4.47 Avaliação de apoptose por citometria de fluxo. Dot plot Anexina-V/PE versus 7AAD com gates para células viáveis, células em apoptose inicial e para células em apoptose tardia e/ou necrose. Amostra: 12º dia de cultivo do segundo teste de recirculação continua (48 h após o acionamento da bomba a 1000 rpm).....	98
Figura 4.48. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo durante o segundo teste de recirculação continua.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Tempo de atuação da bomba PuraLev® 200MU em cada teste.	39
Tabela 4.1. Dados do teste de calibração do sistema de recirculação.....	43
Tabela 4.2. Dados da cinética de crescimento em batelada no biorreator RALF Plus.	45
Tabela 4.3. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética de crescimento em batelada no biorreator RALF Plus.	46
Tabela 4.4. Dados do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000rpm.	51
Tabela 4.5. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante o experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000rpm.	52
Tabela 4.6. Dados do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000rpm.	55
Tabela 4.7. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante o experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000rpm.	56
Tabela 4.8. Dados do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000rpm.	58
Tabela 4.9 Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante o experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000rpm.	59
Tabela 4.10. Dados da cinética controle em modo semi-contínuo.	62
Tabela 4.11. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética controle em modo semi-contínuo.	63
Tabela 4.12. Dados da cinética de crescimento do primeiro teste de recirculação contínua.	66
Tabela 4.13. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética de crescimento do primeiro teste de recirculação contínua.....	67
Tabela 4.14. Dados da cinética de crescimento do segundo teste de recirculação contínua.	74
Tabela 4.15. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética de crescimento do segundo teste de recirculação contínua.	76
Tabela 4.16. Comparação da viabilidade celular obtida por diferentes metodologias no segundo teste de recirculação contínua.	94
Tabela 4.17. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo durante o segundo teste de recirculação contínua.	98

RESUMO

A produção de biofármacos em plataforma de células animais é normalmente realizada em biorreatores de tanque agitado, garantindo uma distribuição homogênea tanto da suspensão celular quanto de nutrientes, metabólitos e produto no meio de cultivo. Biorreatores operados em modo contínuo em perfusão promovem troca constante de meio de cultivo, com retenção das células no biorreator. Na maioria dos casos, esse tipo de operação necessita de um sistema de recirculação do cultivo por bombeamento, que não afete a viabilidade celular e, conseqüentemente, a qualidade do produto. Recentemente, bombas centrífugas com impelidor de acoplamento magnético começaram a ser testadas em processos biotecnológicos, pois obtiveram excelentes resultados quando utilizadas para circulação sanguínea extracorpórea em pacientes submetidos a *bypass* circulatório. Essas bombas proporcionam um perfil de fluxo e vazão constante, gerando um ambiente hidrodinâmico compatível com a sensibilidade das linhagens celulares empregadas em bioprocessos. O presente trabalho avaliou o impacto do uso de uma bomba centrífuga com impelidor acoplado magneticamente sobre o cultivo de células CHO-EPOhr em um biorreator de tanque agitado (2L). Para tal, a bomba foi montada em uma linha de recirculação do biorreator e diferentes velocidades de rotação do impelidor da bomba e tempos de exposição ao ambiente hidrodinâmico da câmara de bombeamento foram testados. A viabilidade e concentração celular foram monitoradas durante os cultivos, assim como o consumo de glicose, a produção de lactato e a concentração de eritropoetina humana recombinante (EPOhr) produzida. Nos testes iniciais com as velocidades de 1000 e 2000 rpm, recirculando cerca de 20 vezes o volume do cultivo, a concentração celular foi mantida em níveis equivalentes ao cultivo controle e sem queda significativa na viabilidade celular, mantida acima de 80%. No teste realizado com a velocidade de 3000 rpm, foi observada ligeira queda na viabilidade celular após as 20 passagens pela câmara de bombeamento, porém efeitos limitantes relacionados ao cultivo podem ter ocorrido em paralelo. Em experimentos subsequentes, o cultivo foi desafiado à exposição contínua ao estresse mecânico da câmara de bombeamento (> 10 dias), com a recirculação de até 1380 vezes o volume do biorreator, diariamente, sem impacto na capacidade proliferativa, viabilidade celular, ciclo celular, metabolismo energético (consumo de glicose e produção de lactato) e produção da proteína de interesse, quando comparado ao cultivo sem o uso da bomba. Os testes com a bomba centrífuga demonstraram resultados satisfatórios considerando a influência da recirculação sobre a fisiologia do cultivo da linhagem de células CHO avaliada, sem afetar características importantes como viabilidade celular e proliferação, mesmo com taxas de recirculação superiores as normalmente utilizadas em um processo industrial. Estes resultados sugerem que o dispositivo pode ser empregado em processos industriais envolvendo linhagens sensíveis a tensões hidrodinâmicas.

ABSTRACT

The production of therapeutic recombinant proteins based on mammalian cell culture systems is usually done using stirred tank bioreactors, providing a homogenous distribution of cells, nutrients, metabolites and product. Bioreactors operated in perfusion mode promote continuously exchange of culture medium with cell retention inside the bioreactor. In most cases, the employment of a pump system is necessary to recirculate the cell suspension. Pumps used to handle the fluid in perfusion circuit need to be gentle so they do not affect cell viability and consequently the product quality. Magnetic levitated centrifugal pumps have been recently tested in bioprocess, due to excellent results when applied in extracorporeal blood circulation. These pumps provide constant flow rates resulting in hydrodynamic environment compatible with the sensibility of cell lineages employed in biopharmaceutical production. The present study evaluated the effects of a magnetic levitated centrifugal pump applied on suspended CHO-rhEPO cells cultivated in a 2L stirred tank bioreactor. A recirculation loop was assembled connecting the pump and the bioreactor for testing different pump speeds and exposure times to the hydrodynamic environment of the pumping chamber. Cell viability and concentration were monitored during the experiments and glucose consumption, lactate production and recombinant human erythropoietin (rhEPO) concentration in the supernatant were also analyzed. Preliminary tests, that recirculated 20 times the vessel volume, showed that using 1000 and 2000 rpm pump speeds the cell viability were not affected, remained above 80% and cell concentration was similar to control culture. In the test performed using 3000 rpm a slight decrease in cell viability was observed after recirculation, but it could be caused by some limitations during cultivation. In subsequent experiments, the culture was challenged to continuous exposure to mechanical stress of the pumping chamber (>10 days). Daily recirculation of 1380 times the vessel volume did not impact on proliferative profile, cell viability, cell cycle, glucose consumption, lactate production or rhEPO production compared to the control culture. Magnetic levitated centrifugal pump tests demonstrated satisfactory results considering the influence of recirculation on the culture physiology of the CHO cell lineage evaluated, without affecting important characteristics such as cell viability and proliferation, even with recirculation rates higher than those normally used in an industrial process. These results suggest that the device can be used in industrial processes involving lineages sensitive to hydrodynamic stresses.

1. INTRODUÇÃO

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é a unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, reativos e biofármacos voltados a atender prioritariamente às demandas de saúde pública nacional (Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, 2016).

Biofármacos constituem uma classe de produtos biológicos, obtidos por meio de processos biotecnológicos, que englobam proteínas recombinantes terapêuticas como hormônios, anticorpos monoclonais, citocinas e enzimas, e também produtos baseados em ácidos nucleicos, utilizados em terapia gênica e tecnologia anti-senso (RNA) (Walsh, 2010). Com alto valor agregado e um mercado em expansão, os produtos alcançam a faixa dos bilhões de dólares em vendas anuais. Até 2014, 246 novos produtos desta classe haviam sido aprovados para comercialização (Walsh, 2014).

Dados de 2013 apontam que apesar de equivalerem a cerca de 5% dos medicamentos comprados pelo Ministério da Saúde, os biofármacos representam 43% dos seus gastos com esses insumos. Este percentual equivale a quase R\$ 5 bilhões por ano, dentro dos R\$ 11 bilhões gastos na compra de medicamentos (Ministério da Saúde, 2013). O cenário citado torna cada vez mais urgente e necessária a nacionalização da produção desse tipo de medicamento, adquiridos atualmente, em sua maioria, por importação.

O Ministério da saúde anunciou uma série de parcerias para desenvolvimento produtivo (PDP) destinadas ao desenvolvimento, transferência e absorção de tecnologia, produção, capacitação produtiva e tecnológica do país em produtos estratégicos para atendimento às demandas do Sistema Único de Saúde (SUS). Em sua maior parte, essas parcerias envolvem transferências de tecnologia, uma forma mais rápida e barata de iniciar a produção de um biofármaco, já que o custo e o tempo gastos na identificação da molécula, desenvolvimento do processo e testes clínicos são eliminados. Além disso, as transferências de tecnologia possibilitam incorporação

de conhecimento técnico e de novas tecnologias, que futuramente poderão ser utilizadas para o desenvolvimento e produção de novos medicamentos.

Durante o período da transferência, a empresa farmacêutica ganha exclusividade de fornecimento do produto para o SUS para atender a uma fração de sua demanda, possibilitando a negociação de preços mais baixos e reduzindo as despesas do governo com a compra do medicamento. Ao longo da transferência, os parceiros receptores da tecnologia incorporam o conhecimento tecnológico envolvido nas etapas produtivas, passando a processar primeiramente etapas finais da produção, como embalagem, rotulagem e envase, possibilitando, desde esse momento, a redução do custo do produto final. Essa parceria é finalizada com a incorporação das etapas de formulação e produção do ingrediente farmacêutico ativo (IFA), resultando na nacionalização de todo o processo produtivo (Ministério da Saúde, 2014).

O recém-inaugurado Centro Henrique Penna (Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico), construído no campus sede da Fiocruz no Rio de Janeiro, em Manguinhos, conta com uma área de fabricação de ingrediente farmacêutico ativo de biofármacos baseada em uma plataforma de produção em células animais. Esta planta tem capacidade instalada para produção da demanda anual de Alfaeopetina (Eritropoetina Humana Recombinante - EPOhr), atualmente já fornecida para o ministério da saúde por Bio-Manguinhos. Além disso, viabilizará também a produção, na forma de campanhas, de outros biofármacos frutos de parcerias para o desenvolvimento produtivo (Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, 2017).

A área está equipada com biorreatores tipo tanque agitado, com capacidade para operação em perfusão. O modo de operação contínuo com reciclo celular (perfusão) possibilita a troca constante de meio de cultivo, com retenção das células no biorreator. Equipamentos que promovem separação de sólidos e líquidos (células e meio de cultivo) são responsáveis por reter as células no biorreator. Esses equipamentos são denominados dispositivos de retenção celular e podem ser internos ou externos ao biorreator. Para o caso de utilização de dispositivos externos, uma linha de alimentação é responsável pela recirculação da suspensão celular, levando o meio de cultivo contendo células e produto até o dispositivo de retenção celular e retornando o concentrado de células ao biorreator. A movimentação da suspensão nesta linha de alimentação é realizada por bombeamento, e é fundamental que esta etapa do processo não afete a fisiologia das células em cultivo. O presente trabalho

tem por objetivo avaliar um tipo de bomba que pode ser empregada nesta etapa de recirculação, verificando seu impacto no cultivo de células CHO recombinantes.

1.1. Sistemas de expressão de proteínas recombinantes

A grande maioria dos biofármacos é composta por proteínas que, a partir dos inúmeros avanços na área de engenharia genética, passaram a ser produzidas por meio da tecnologia do DNA recombinante. A escolha do sistema de expressão para a produção dessas proteínas deve levar em consideração a estrutura e funcionalidade proteica, a velocidade de produção e o rendimento almejado (Costa et al. 2013). Diversos sistemas heterólogos de expressão e produção de proteínas recombinantes estão disponíveis atualmente. Estes sistemas podem ser baseados em plataformas que utilizam: procariotos, tendo como principal representante a bactéria *Escherichia coli*, fungos filamentosos e leveduriformes, sistema de células de inseto e baculovírus, plantas e células vegetais, células animais e animais transgênicos, além de plataformas acelulares (Endo e Sawasaki, 2006; Costa et al. 2013).

A produção utilizando sistemas procariotos é capaz de alcançar altas concentrações da proteína de interesse, além de apresentar um menor custo produtivo. Estas características são decorrentes da alta taxa proliferativa das células utilizadas e de uma demanda nutricional mais simples. No entanto, este sistema possui desvantagens como a formação de corpos de inclusão, formação ineficiente de pontes dissulfeto e a falta de maquinaria biossintética para realizar importantes modificações pós-traducionais como a glicosilação (Sahdev et al. 2008).

Grande parte dos biofármacos tem como característica apresentar uma ou mais modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, carboxilação, fosforilação, acetilação, entre outras. Essas modificações normalmente influenciam as propriedades bioquímicas e terapêuticas da proteína. Portanto a escolha do sistema de expressão mais apropriado para a produção, que seja capaz de executar as modificações pós-traducionais necessárias, é um passo crucial no desenvolvimento desses medicamentos (Walsh, 2010).

A plataforma que vem se mostrando mais adequada para a produção de biofármacos que necessitam de modificações pós-traducionais complexas é baseada em células de mamíferos. A principal linhagem celular utilizada pela indústria biofarmacêutica, atualmente, é a CHO (*chinese hamster ovary*), empregada na

produção de 35,5% do total de biofármacos aprovados até 2014 (Walsh, 2014). Apesar do elevado custo com insumos e estrutura para produção, o sistema apresenta boa capacidade para secreção de proteínas heterólogas, além de ser capaz de realizar as modificações pós-traducionais que mais se assemelham ao padrão humano e que influenciam diretamente a imunogenicidade, a meia vida plasmática e a própria atividade biológica do produto biológico terapêutico (Junker e Young, 2014).

A preferência pela utilização de células CHO se deve principalmente ao fato de se mostrar, há algumas décadas, uma plataforma segura, facilitando a aprovação de novos produtos pelas agências regulatórias, visto que os principais patógenos humanos, incluindo os vírus HIV, pólio, herpes, entre outros, não se replicam em células CHO (Bandaranayake e Almo, 2014). A baixa produtividade específica, inerente às linhagens de células animais, pode ser contornada com a amplificação de genes, com sistemas como os das enzimas diidrofolato redutase (DHFR) e glutamina sintetase (GS). Além disso, as células CHO são facilmente adaptadas ao crescimento livre de soro (exigência das agências regulatórias) e em suspensão, facilitando a recuperação do produto de interesse e o monitoramento do cultivo, respectivamente, e assim possibilitando que os processos em grande escala sejam conduzidos de forma mais segura e eficiente (Kim et al. 2012).

1.2. Sistemas de cultivo para células animais

Células animais podem ser cultivadas em diversos tipos de sistemas, baseados em necessidades e características de cada linhagem celular. Sistemas de cultivo em pequena escala (Figura 1.1), como frascos estacionários tipo T e garrafas rotatórias são utilizados principalmente para o cultivo de células em escala laboratorial e no preparo do inóculo para escalas maiores. Estes sistemas são descartáveis e não possuem sistemas de monitoramento e controle, havendo necessidade de incubá-los em estufas, para o controle da temperatura e, em alguns casos, pH (incubadoras de CO₂). O fornecimento de oxigênio se dá através da interface entre o meio de cultivo e o ar presente no frasco. Alguns modelos possuem a tampa ventilada, protegida por um filtro hidrofóbico, para facilitar a troca de gases. Células adaptadas ao crescimento em suspensão também são frequentemente cultivadas, em escala laboratorial, em frascos agitados como os frascos tipo *spinner*, com agitador imerso na suspensão celular, ou frascos tipo *shaker*, incubados em agitadores rotativos. A maior eficiência

na transferência de oxigênio para o meio líquido, devido a agitação nestes frascos, possibilita o aumento da densidade celular no cultivo (Chico et al. 2008).

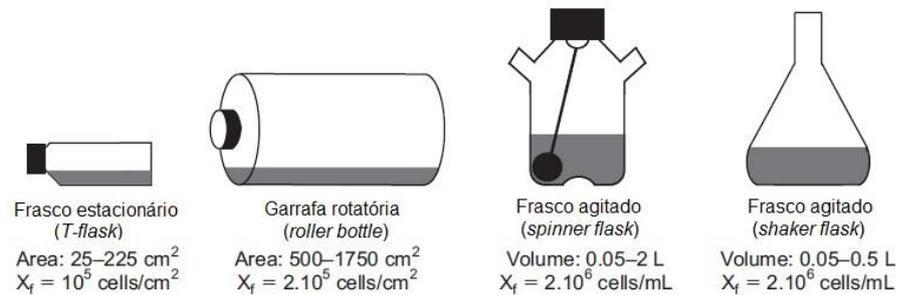


Figura 1.1. Sistemas de cultivo em pequena escala. Fonte: Chico et al. 2008.

Em escala industrial, as células geralmente são cultivadas em suspensão, em dispositivos denominados biorreatores, com agitação constante, de forma a manter uma distribuição homogênea de células, nutrientes, oxigênio dissolvido, metabólitos e produto, facilitando a sua ampliação de escala, permitindo um monitoramento mais eficiente das condições da cultura e possibilitando cultivos com maiores densidades, e conseqüentemente, maior produção da proteína de interesse (Chu e Robinson, 2001). Algumas linhagens celulares naturalmente aderentes, quando não podem ser adaptadas ao crescimento em suspensão, são cultivadas aderidas a microcarregadores, que são pequenas esferas fabricadas em materiais como celulose, vidro, colágeno, entre outros, utilizadas como superfície de ancoragem para as células (Wang et al. 2005). Os microcarregadores podem apresentar estrutura macroporosa, permitindo o crescimento celular no seu interior, e microporosa, onde as células crescem somente na superfície. O primeiro tipo é capaz de sustentar uma maior concentração de células por esfera, porém as regiões mais internas podem sofrer com problemas de disponibilidade de nutrientes e acúmulo de metabólitos.

Há vários tipos de biorreatores disponíveis no mercado, que podem ser classificados em duas grandes categorias: biorreatores homogêneos e heterogêneos, levando em consideração a distribuição das células no fluido. Os que apresentam as células uniformemente distribuídas são considerados homogêneos. Entre eles, podemos citar os biorreatores tipo tanque agitado com células em suspensão (um dos tipos mais utilizados para a produção de biofármacos), o tipo *air-lift* e o biorreator de ondas (Figura 1.2). O biorreator tipo tanque agitado promove a agitação do cultivo por meio de impelidores, o tipo *air-lift* utiliza uma corrente gasosa associada à geometria do biorreator para homogeneização do líquido, já o biorreator de ondas dispõe de uma

plataforma com movimentos oscilatórios (Chico et al. 2008; Kuystermans e Al-Rubeai, 2011).

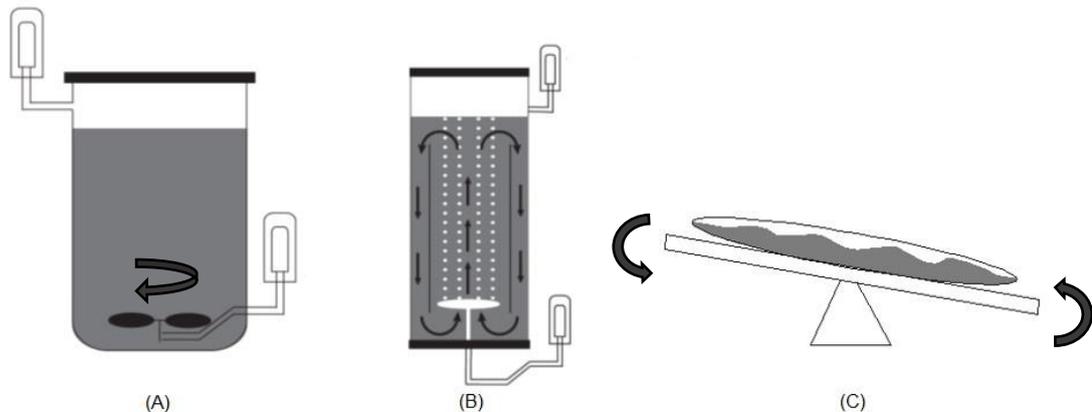


Figura 1.2. Tipos de biorreatores homogêneos. (A) Biorreator tipo tanque agitado. (B) Biorreator tipo air-lift. (C) Biorreator de ondas. Fonte: Adaptado de Chico et al, 2008.

Biorreatores em que as células se encontram imobilizadas em um suporte, como os de leito empacotado, leito fluidizado, os de fibras ocas e os cultivos baseados em microcarregadores em tanques agitados, são considerados sistemas heterogêneos. Quando o cultivo se dá em sistemas compartimentalizados como os biorreatores heterogêneos, a distribuição de nutrientes deve ser feita através do bombeamento do meio de forma que este flua pelos compartimentos onde as células estão imobilizadas. Uma das limitações para o uso dessa classe de biorreatores é a dificuldade na obtenção de amostras homogêneas representativas do cultivo, seja pela formação de gradientes na concentração de nutrientes e metabólitos ou pela inacessibilidade das células (Warnock e Al-Rubeai, 2006; Chico et al. 2008).

Os biorreatores de tanque agitado podem ser utilizados em cultivos homogêneos ou heterogêneos, com células em suspensão ou aderidas a microcarregadores. São semelhantes aos fermentadores empregados no cultivo industrial de microrganismos, onde a agitação do sistema é feita por um impelidor e normalmente a aeração se dá por borbulhamento na parte inferior do tanque, além de uma entrada de gases na parte superior para garantir a troca superficial de gases entre as fases líquida e gasosa e garantir a pressão positiva do tanque, importante para a segurança da estanqueidade do sistema. Em escala industrial, os tanques costumam ser de aço inoxidável, utilizando-se vapor corrente para sua esterilização e um sistema de sanitização incorporado CIP (*Clean In Place*), que fornece e distribui o fluido sanitizante, normalmente soda, por toda a superfície interna e dispositivos que entram em contato com o cultivo. São passíveis de aumento de escala, podendo variar

em uma faixa de poucos litros até dezenas de milhares de litros. Há décadas, é o sistema mais utilizado para a produção de biofármacos (Chisti, 1993; Wang et al. 2005; Chico et al. 2008).

Os biorreatores contam com malhas de controle dos principais parâmetros do processo, normalmente pH, temperatura e oxigênio dissolvido. Sensores específicos fornecem, em tempo real, valores dos parâmetros monitorados para o sistema. Esses valores são comparados com os valores inicialmente informados como ideais para o processo (*setpoints*) e, baseado na diferença entre eles, um sinal é gerado pelo controlador para que os atuadores (como resistências elétricas e bombas de injeção) sejam ativados proporcionalmente. A injeção de oxigênio no sistema pode ser regulada por diferentes cascatas de controle, adaptadas à velocidade do consumo de oxigênio, que varia com a densidade celular no biorreator. O controle de pH é feito por injeção de CO₂ e/ou adição de base, para controlar o sistema de tamponamento com bicarbonato de sódio presente no meio de cultivo. A temperatura normalmente é controlada por uma jaqueta térmica que envolve o vaso do biorreator. A homogeneidade do cultivo é mantida pela agitação do ambiente, normalmente realizada por impelidores, que têm a sua velocidade monitorada e controlada de forma mais simples para manter uma velocidade fixa (Tonso, 2008).

1.3. Modos de operação de biorreatores

O processo de produção de biofármacos pode ser realizado em diferentes modos de operação, como batelada, batelada alimentada, contínuo e em perfusão. As principais diferenças entre eles são o tempo de cultivo, fornecimento de nutrientes, remoção de metabólitos tóxicos e retirada de produto e células, como mostra a representação esquemática da Figura 1.3. O modelo de operação mais adequado é definido de acordo com alguns fatores, como a estabilidade da proteína de interesse, a resistência das células a altas concentrações de metabólitos tóxicos, a tensões de cisalhamento e outros esforços mecânicos, além de fatores econômicos e operacionais (Chu e Robinson, 2001; Pollock, 2013).

Os cultivos em batelada se caracterizam pela manutenção do volume de suspensão celular do início ao fim da operação do biorreator, sem fornecimento adicional de nutrientes durante o processo. Também não há retirada de metabólitos, produto ou células. Após o inóculo, as células cultivadas consomem os nutrientes,

sintetizam o produto de interesse e liberam metabólitos provenientes de suas reações bioquímicas. O risco de contaminação com microrganismos é mais baixo, já que a manipulação do sistema é menor do que em outros modos de operação. Em compensação, a produtividade volumétrica é baixa, pois não se atingem altas densidades celulares. Isto ocorre devido à limitação da disponibilidade inicial de nutrientes, que não pode ser maior devido aos efeitos osmóticos que podem causar morte celular (Chico et al. 2008).

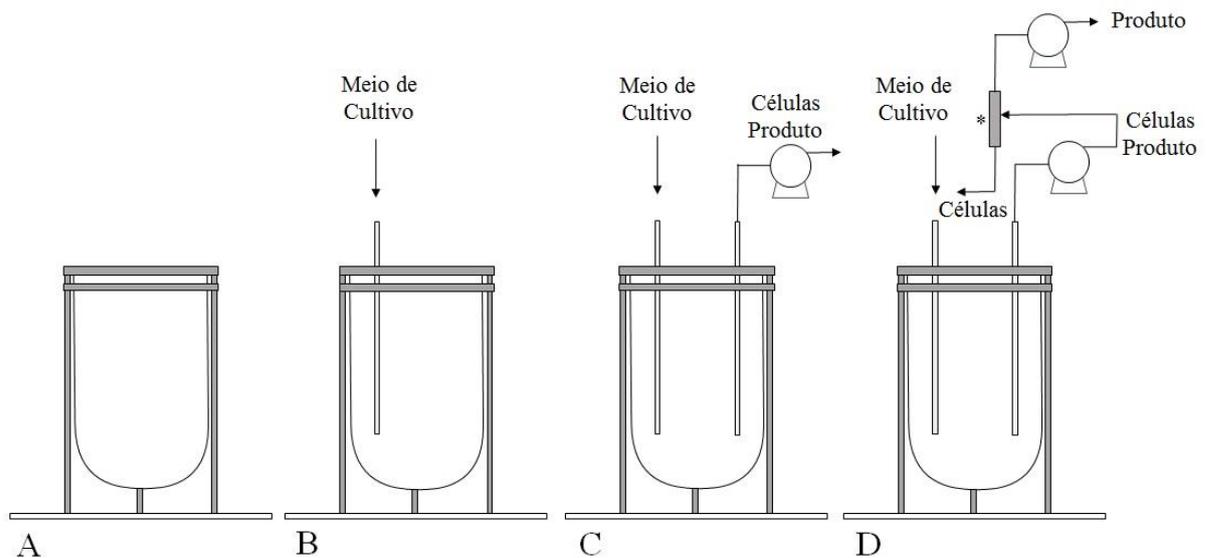


Figura 1.3. Esquema representando os diferentes modos de operação de biorreatores. (A) Batelada simples. (B) Batelada alimentada. (C) Contínuo. (D) Contínuo em perfusão. *Dispositivo de retenção celular

Uma variação do modo de operação em batelada é a batelada alimentada, na qual o volume inicial do cultivo é menor que o volume de trabalho do sistema de cultivo, possibilitando adição de nutrientes durante o processo de produção. Essa estratégia permite aumentar o tempo de cultivo e a densidade celular, elevando conseqüentemente a produção do biofármaco. A produtividade é geralmente limitada pelo acúmulo de metabólitos tóxicos, que podem inibir o crescimento celular, afetar a viabilidade e a produção (Chico et al. 2008).

No modo de operação contínuo, há adição constante de meio de cultivo fresco e remoção de meio exaurido contendo células e produto. Estas duas intervenções devem ocorrer com taxas compatibilizadas, possibilitando a conservação do volume no biorreator, a redução do acúmulo de metabólitos, manutenção da densidade celular e da disponibilidade de nutrientes. O ajuste fino da taxa de diluição do biorreator

(volume de cultivo trocado por dia) deve ser compatibilizado com a demanda nutricional e concentração celular, além da estabilidade do produto. Isto permite que o cultivo mantenha a concentração constante de células e suprimento de nutrientes para garantir a viabilidade celular, sem afetar a qualidade do produto. O ajuste da taxa de diluição em relação à taxa específica de crescimento celular permite que seja alcançado um equilíbrio na concentração de células. No entanto, a constante retirada de células do sistema não permite que altas densidades celulares sejam alcançadas, impactando na produtividade (Chico et al. 2008).

Quando há retenção de células durante o modo de operação contínuo, o processo é conhecido como perfusão, sendo capaz de alcançar maior densidade celular e, conseqüentemente, maior produtividade volumétrica. Para isso, é necessário um dispositivo de retenção celular, que permite a passagem do meio cultivado, devolvendo para o biorreator a maior parte da massa celular que foi circulada. Este modo de operação é mais complexo, mas possibilita um tempo prolongado de cultivo, já que há sempre nutrientes disponíveis e baixas concentrações de metabólitos tóxicos. A troca contínua de meio de cultivo permite que as células cresçam até alcançarem um patamar, normalmente limitado pela capacidade máxima de transferência de oxigênio do sistema do biorreator. Quando a concentração celular desejada é alcançada, um processo controlado de sangria do biorreator pode ser utilizado para manter as células em constante duplicação. A estratégia utilizada dependerá de características das células, da estabilidade do produto e se a formação de produto está associada ou não ao crescimento celular. O modo contínuo em perfusão é uma estratégia importante para produtos sensíveis, pois diminui o tempo de residência do produto no biorreator, além de que as altas densidades celulares levam a uma maior produtividade por volume de cultivo. Desta forma, é possível trabalhar com biorreatores menores do que os operados em batelada ou batelada alimentada, porém com maior consumo de meio de cultivo (Chu e Robinson, 2001; Wang et al. 2005; Chico et al. 2008; Chotteau, 2015).

1.3.1. Dispositivos para retenção celular

Os dispositivos para retenção celular normalmente se baseiam na separação por tamanho, massa e densidade da partícula, lançando mão de processos de separação por filtração, sedimentação e centrifugação. É necessário que o dispositivo

ofereça alta eficiência de separação, não cause danos às células e possa operar com segurança por longos períodos de tempo (Castilho e Medronho, 2008).

A separação por sedimentação gravitacional utiliza o campo gravitacional para promover a sedimentação, e conseqüente separação das células do meio de cultivo. Os dois principais tipos de sedimentadores gravitacionais são os sedimentadores verticais e os lamelares (Figura 1.4 A e B, respectivamente). A sedimentação pode ocorrer também pela ação de um campo centrífugo. A aplicação de aceleração centrífuga às partículas em suspensão é feita por meio de um movimento de rotação, promovendo a separação por massa específica (densidade). As células acumuladas na região mais externa do equipamento podem ser recuperadas, enquanto o meio de cultivo clarificado é coletado na região central. As centrífugas podem ser tubulares, de discos ou de passes múltiplos, conforme demonstrado na Figura 1.4 C, D e E, respectivamente (Castilho e Medronho, 2008; Voisard et al. 2003).

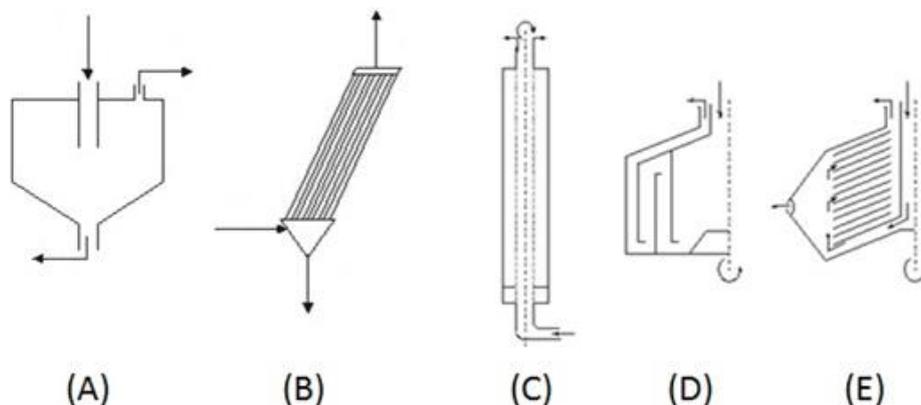


Figura 1.4. Dispositivos de retenção por sedimentação. (A) Sedimentador gravitacional vertical. (B) Sedimentador gravitacional lamelar. (C) Centrífuga tubular. (D) Centrífuga de passes múltiplos. (E) Centrífuga de discos. Fonte: Adaptado de Castilho e Medronho, 2008.

Dispositivos conhecidos como hidrociclones também utilizam sedimentação em campo centrífugo, gerado pelo escoamento do fluido, para separação de células em suspensão (Figura 1.5). A suspensão celular passa pelo dispositivo, que devido à sua geometria cônica, direciona uma parte do fluido contendo partículas mais densas ou maiores (células) pelo orifício inferior de diâmetro reduzido, retornando ao biorreator. O restante do fluido forma um vórtex secundário ascendente interno e sai pelo orifício superior, juntamente com partículas menores, como *debris* celulares e células de menor tamanho (Castilho e Medronho, 2008; Pinto et al. 2008; Voisard et al. 2003).

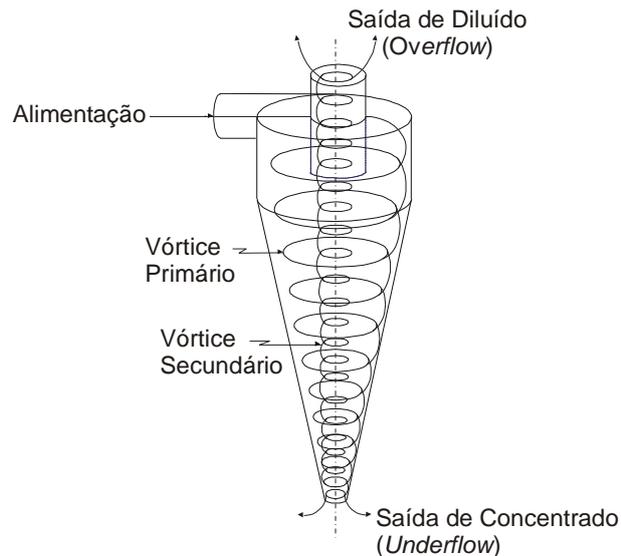


Figura 1.5. Esquema representativo e princípio de funcionamento de um hidrociclone. Fonte: Castilho e Medronho, 2008.

A separação por filtração se dá pela utilização de um meio filtrante, que retém partículas maiores que seus poros. A filtração tangencial utiliza um dispositivo por onde o fluido é bombeado tangencialmente à área de filtração, normalmente, composta por membranas porosas. O fluido e as partículas de menor tamanho, como *debris* celulares, atravessam a membrana. A corrente que não permeou a membrana leva as células, agora concentradas, ao final do dispositivo, para que retornem ao biorreator (Figura 1.6). O sistema evita entupimentos devido ao ambiente hidrodinâmico gerado na superfície do filtro e, conseqüentemente, prolonga a operação do dispositivo.

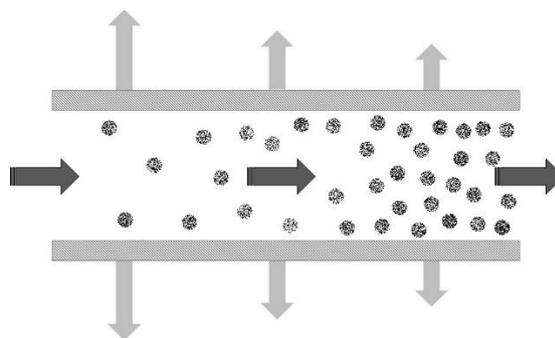


Figura 1.6. Esquema representativo da filtração tangencial.

Outro dispositivo amplamente utilizado em processos de perfusão é o filtro de malha rotativa, que pode ser interno ou externo ao biorreator. Um cilindro, cuja parede é formada por uma malha filtrante, gira submerso na suspensão celular (Figura 1.7).

Os vórtices gerados pelo movimento do cilindro afastam as células da malha filtrante, permitindo a passagem do meio de cultivo para o seu interior. O meio de cultivo é retirado do interior da malha, por bombeamento, e a suspensão celular concentrada, exterior à malha, permanece (no caso dos dispositivos internos - *spinfilters*) ou é devolvida (no caso dos dispositivos externos – *rotor filters*) ao biorreator (Castilho e Medronho, 2008; Figueredo-Cardero, 2014).

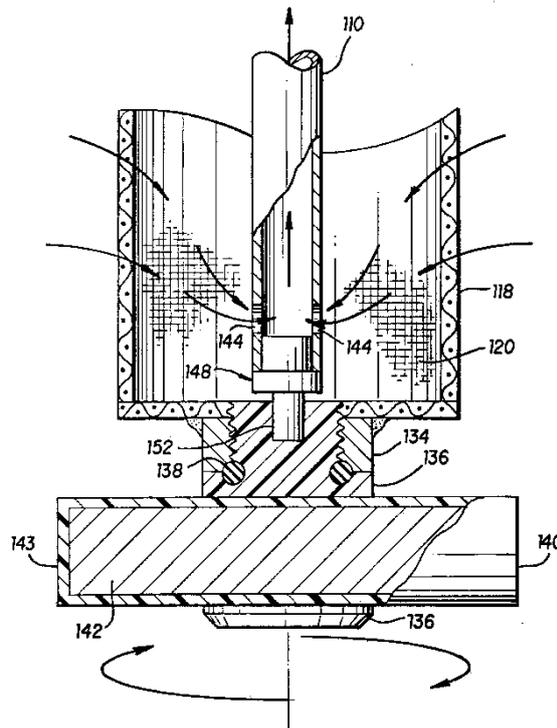


Figura 1.7. Esquema representativo do filtro de malha rotativa. Fonte: Fike et al. 1992.

Os sistemas de retenção externos ao biorreator necessitam de um circuito com linhas para alimentação do dispositivo, devolução da corrente de reciclo ao biorreator e retirada da corrente de perfundido. O deslocamento do fluido nesse sistema é realizado por bombeamento em pontos específicos das linhas. A Figura 1.8 apresenta o esquema de um biorreator operado em perfusão com a representação do sistema de retenção celular e suas linhas de transferência de suspensão celular. A linha de alimentação do dispositivo de retenção celular leva a suspensão retirada do biorreator, contendo meio de cultivo, células e o produto de interesse, para o interior do equipamento de separação celular. As células concentradas pelo dispositivo são devolvidas ao biorreator por uma corrente de reciclo. O meio de cultivo exaurido, com o produto de interesse, é retirado do dispositivo pela corrente de perfundido. Em

processos de perfusão, as células podem passar pelo sistema de retenção diversas vezes por dia, desta forma, é necessário que o dispositivo de retenção e seu sistema de bombeamento não interfiram na fisiologia celular, mantendo alta a viabilidade do cultivo, sem impacto à qualidade do produto de interesse.

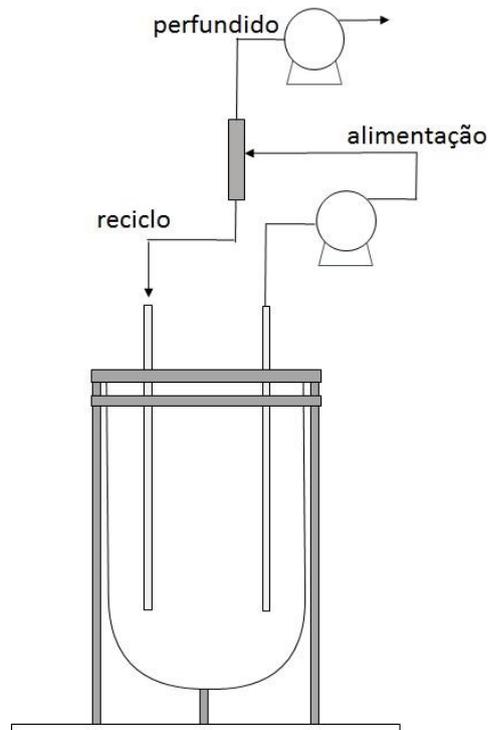


Figura 1. 8. Esquema com as linhas de alimentação do dispositivo de retenção celular, reciclo e perfundido, em biorreator operado em perfusão.

1.3.2. Bombas para recirculação da suspensão celular

Em bombas de deslocamento positivo, como as bombas peristálticas e de diafragma, a transferência de energia é feita por variações de volume que ocorrem devido ao movimento da fronteira na qual o fluido está confinado. Esse mecanismo apresenta algumas desvantagens para o processo de recirculação da suspensão celular, como fluxo e pressão intermitentes, alta tensão de cisalhamento e, no caso das bombas peristálticas, desgaste da mangueira no ponto de contato com a bomba (Blaschczok et al. 2013).

Bombas centrífugas direcionam o fluxo do fluido por meio de pás ou lâminas, que se encontram fixadas em um elemento rotativo, denominado rotor. Apesar de apresentarem fluxo contínuo e vazões mais altas, em bombas convencionais o contato do fluido com o eixo do rotor pode, igualmente, gerar estresse mecânico às células.

Recentemente, bombas centrífugas com impelidor de acoplamento magnético começaram a ser testadas em processos biotecnológicos, pois obtiveram excelentes resultados durante a utilização para circulação sanguínea extracorpórea em pacientes submetidos a *bypass* circulatório (Barbone et al. 2012; Sung et al. 2015). Nestas bombas, o motor transmite o torque ao impelidor por meio de um campo eletromagnético criado por ação dos ímãs instalados no eixo do motor elétrico e no impelidor. A ausência de um eixo do rotor reduz a exposição das células a tensões de cisalhamento que seriam geradas pelo atrito com o meio (Taskin et al. 2010; Bottrell et al. 2014). Blaschczok e colaboradores (2013) utilizaram células CHO para verificar o impacto da recirculação, realizada com diferentes tipos de bomba, na viabilidade celular. A bomba centrífuga com impelidor magnético foi comparada a uma bomba peristáltica e a uma bomba com diafragma e 4 pistões (Quattro Flow), e apresentou taxas de morte celular significativamente menores. Uma bomba centrífuga com impelidor magnético será o objeto de estudo deste trabalho.

1.4. Estresse mecânico e fisiologia celular

Durante o cultivo celular, as células estão expostas e precisam suportar vários tipos de estresse, tanto físicos quanto químicos. A temperatura, agentes tensoativos e tensões de cisalhamento causadas pela agitação ou pela aeração são exemplos de estresse físico. Já as variações de pH, na concentração de metabólitos, de oxigênio, de dióxido de carbono formado ou de químicos adicionados podem gerar estresse químico. As consequências desse estresse podem ser avaliadas por meio da análise da viabilidade celular ou de mudanças fisiológicas que afetam a capacidade proliferativa das células (Boudrant et al. 2008).

Durante o processo de reprodução celular, as células passam por fases de verificação dos ambientes extra e intracelular, para garantir que as condições sejam favoráveis à replicação. O ciclo de vida de uma célula está basicamente dividido em duas etapas: a etapa em que o conteúdo celular é duplicado, conhecida como fase de síntese (S), e a etapa em que a célula se divide dando origem a duas novas células, denominada mitose (M). A verificação das condições ambientais ocorre nos intervalos entre a fase de síntese e a mitose, chamados de *gap 1* (G1) e *gap 2* (G2), conforme representação na Figura 1.9. Caso as condições sejam favoráveis, a célula progride no ciclo celular, avançando para próxima fase. No entanto, se algum problema é

detectado, não é possível continuar o processo de proliferação. Os diferentes tipos de estresse mencionados podem impedir a síntese de DNA e reter as células na fase G1, induzindo a morte celular ou levando a um estado de quiescente, denominado G0, onde podem permanecer por tempo indefinido até retornar ao estado proliferativo (Pellegrini et al. 2008).

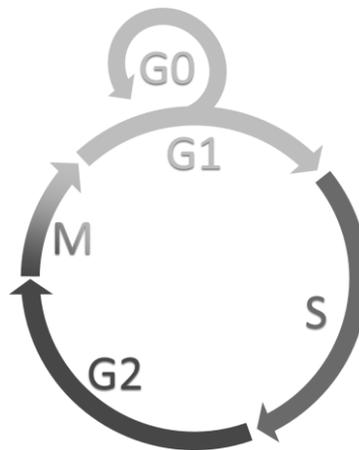


Figura 1.9. Esquema representativo das fases do ciclo celular. Mitose (fase M). Gap 1 (fase G1). Gap 0 (fase G0). Síntese (fase S). Gap 2 (fase G2).

Células animais são afetadas por forças hidrodinâmicas durante o bioprocessamento, principalmente por não possuírem parede celular rígida capaz de protegê-las, como acontece com alguns microrganismos. Dependendo do tipo, da intensidade e da duração do estresse, é possível observar diferentes respostas ao estímulo, tanto bioquímicas quanto fisiológicas, desde a destruição mecânica das células, danos irreversíveis à estrutura celular que levam à morte por necrose, indução à morte programada, até mudanças no perfil das proteínas produzidas pelas células recombinantes (Al-Rubeai et al. 1995; Mardikar e Niranjani, 1999; Chisti, 2001). Enzimas e produtos com processamento incompleto liberados por células lisadas podem degradar a proteína de interesse, alterar o perfil de glicosilação do produto recuperado e afetar o processo de purificação (Browne e Al-Rubeai, 2011).

A morte celular por necrose não é considerada um processo fisiológico e é desencadeada em decorrência a algum dano irreversível na membrana plasmática. Com alterações no sistema de transporte iônico e a incapacidade de regular a pressão osmótica, observa-se inchaço citoplasmático, formação de vacúolos, distensão ou rompimento mitocondrial, lise de lisossomos, rompimento da membrana plasmática e

extravasamento do conteúdo celular (Pellegrini et al. 2008), conforme observado na Figura 1.10.

O processo de morte celular programada por apoptose em cultivos de linhagens celulares se deve, principalmente, ao estresse gerado por mudanças nas condições ambientais. A exposição a altas concentrações de metabólitos tóxicos, alterações no pH, falta ou exaustão de nutrientes e tensões de cisalhamento podem desencadear o processo de morte, por diferentes vias, que podem ser classificadas como intrínseca ou extrínseca, dependendo da origem do sinal de morte.

A via intrínseca pode ser desencadeada por vários estímulos intracelulares, como danos no DNA, ausência de fatores de crescimento e estresse oxidativo. Esses estímulos ativam cascatas de sinalização que tem como consequência a permeabilização da membrana externa das mitocôndrias, resultando em um extravasamento de proteínas e fatores apoptóticos mitocondriais, como, por exemplo, o citocromo C. Esses fatores estão envolvidos na ativação das caspases iniciadoras, neste caso, a caspase 9, que por sua vez ativam as caspases executoras 3, 6 e 7, enzimas responsáveis pelas alterações fisiológicas e morfológicas características de células em processo de apoptose (Arden e Betenbaugh, 2004).

Já a via extrínseca é desencadeada por meio da ativação de receptores de superfície celular por fatores de morte (ligantes) extracelulares. Esses receptores promovem a transdução do sinal de morte, culminando na ativação das caspases iniciadoras, neste caso, as caspases 8 e 10, responsáveis também pela ativação das caspases executoras. Apesar de distintos estímulos ativarem diferentes vias iniciais, a etapa de ativação das caspases representa um estado tardio e comum a todas as células em processo de apoptose (Arden e Betenbaugh, 2004).

As células em processo de apoptose apresentam características bioquímicas e morfológicas específicas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa, quando a apoptose é ativada pela via intrínseca. É observada translocação do fosfolípido fosfatidilserina, presente apenas no folheto interno da membrana plasmática, para o folheto externo, atuando como sinalização para o reconhecimento de células apoptóticas pelo sistema fagocitário. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o material genético se desintegra em fragmentos múltiplos de 180-200 pb, envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da

membrana celular aumentam de número e tamanho e se destacam da célula, originando pequenas estruturas com o conteúdo celular, conforme apresentado na Figura 1.10. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominados corpos apoptóticos. *In vivo*, os corpos apoptóticos são fagocitados, mas em cultivos celulares acabam, eventualmente, sofrendo lise, assim como as células necróticas (Pellegrini et al. 2008).

Autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente, resultado da resposta a um estresse metabólico, que promove a degradação de componentes celulares. Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos, que irão se fundir com os lisossomos (Figura 1.10). Em seguida, o conteúdo dos autofagossomos é degradado pelas hidrolases lisossomais (Krampe e Al-Rubeai, 2010).

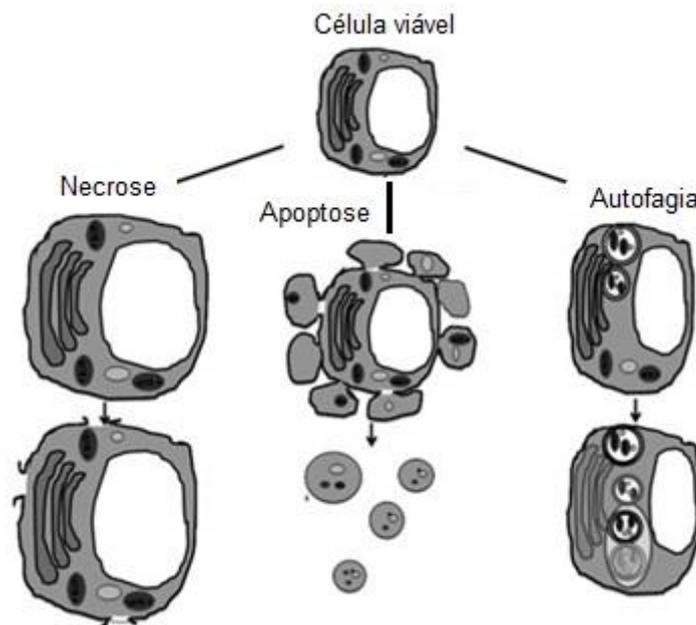


Figura 1.10. Esquema representativo de características morfológicas durante morte celular por necrose, apoptose e autofagia. Fonte: Adaptado de Krampe e Al-Rubeai, 2010.

O monitoramento da morte celular durante o processo de produção de biofármacos é essencial para que sejam adotadas estratégias de cultivo que evitem a redução da viabilidade celular, e conseqüentemente, a queda da produtividade e alterações na qualidade do produto. Diversos estudos foram realizados baseados na avaliação, monitoramento e controle dos processos de morte por apoptose, durante cultivos celulares (Al-Rubeai et al. 1994; Arden e Betenbaugh, 2004; Mollet et al. 2007;

Schwamb et al. 2013). Apesar da morte por autofagia ser objeto de estudo há várias décadas em processos fisiológicos, sua relevância para os bioprocessos tem ganhado força apenas recentemente (Hwang e Lee, 2008; Kim et al. 2013; Baek et al. 2016). Klein e colaboradores (2015) destacam também a importância de ensaios para a detecção de lise celular, pois apenas com testes que identificam células mortas, seja por necrose ou morte programada, não é possível contabilizar células que se romperam, subestimando o efeito do estresse mecânico no cultivo. Eles sugerem a dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) e de DNA genômico, liberados pelas células no sobrenadante quando ocorre lise celular.

1.5. Ensaios para monitoramento da morte celular

Existem diferentes métodos capazes de evidenciar a morte celular, tanto por necrose, apoptose ou autofagia, baseados na observação da morfologia e de componentes envolvidos especificamente nesses fenômenos. Alguns métodos se baseiam na verificação da integridade da membrana plasmática, como o ensaio que utiliza azul de tripano, corante vital que penetra apenas em células não viáveis que sofreram danos na estrutura da membrana. Este método possibilita a contagem de células coradas e não coradas com a utilização de um hemocítmetro em microscópio óptico ou com equipamentos de contagem automatizados. É possível também utilizar corantes fluorescentes como 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e iodeto de propídeo (PI), para ensaios que determinam a viabilidade celular por citometria de fluxo ou microscopia de epifluorescência (Mollet et al. 2007). Essas metodologias são aplicáveis à identificação de células que morreram pelo processo de necrose, no entanto, células em processo de apoptose, quando cultivadas *in vitro*, acabam por perder a integridade da membrana plasmática e sofrer lise, já que não são fagocitadas pelo sistema imunológico, como ocorre *in vivo*. Portanto, essas metodologias identificam também células em estágios tardios do processo de apoptose, não sendo possível distinguir a via de morte (Pellegrini et al. 2008).

Para detectar células em apoptose inicial, um dos métodos mais utilizados é a marcação da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, como consequência da ativação das caspases em resposta a estímulos apoptóticos. Utiliza-se anexina V marcada com ficoeritrina (PE) ou com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para marcar a fosfatidilserina em conjunto com um corante para verificação da

integridade da membrana plasmática (PI ou 7-AAD) e a leitura é feita por citometria de fluxo. Células coradas apenas pelo complexo anexina-V/PE (ou FITC) são identificadas como células nos estágios iniciais de apoptose, já as células duplamente marcadas (anexina-V/PE ou FITC e 7AAD/PI) são identificadas como células que estão em estágios avançados de apoptose ou que morreram em decorrência de necrose (Butler et al. 2014).

A fragmentação do DNA característica de células apoptóticas, pode ser detectada com a utilização de metodologias como a eletroforese em gel de agarose e TUNEL. Como o DNA é clivado em fragmentos múltiplos de 180-200 pb, um padrão de bandas em “escada” pode ser observado em uma corrida eletroforética em gel de agarose. No processo de morte por necrose, não existe um padrão específico de clivagem de DNA. Desta forma, a degradação aleatória dá origem a diferentes tamanhos de fragmentos, que não formam bandas definidas no gel de agarose, resultando em um perfil denominado *smear* (borrão). O teste conhecido como TUNEL (*terminal deoxynucleotidil transferase-mediated x-dUTP nick end labeling*) evidencia a fragmentação do DNA com a adição do nucleotídeo x-dUTP (molécula modificada de deoxiuridina-trifosfato) à extremidade do fragmento de DNA, pela ação da enzima deoxinucleotidil-transferase. Este nucleotídeo pode ser marcado com um fluorocromo, enzima ou antígeno, o que permite a detecção dos fragmentos. Quanto mais fragmentado estiver o DNA, mais intensa será a marcação (Butler et al. 2014).

Alterações morfológicas, como a condensação e a fragmentação da cromatina associadas à apoptose, podem ser observadas por microscopia de epifluorescência, com a utilização de corantes como laranja de acridina, brometo de etídeo e iodeto de propídeo. O corante laranja de acridina é capaz de penetrar em células com membrana citoplasmática intacta, já os corantes brometo de etídeo ou iodeto de propídeo penetram apenas em células com a membrana danificada. Quatro padrões de coloração podem ser identificados: as células viáveis apresentam fluorescência verde uniforme no núcleo, devido à ligação do laranja de acridina ao DNA; as células apoptóticas recentes apresentam fluorescência verde, com grânulos corados em verde brilhante na região nuclear, evidenciando a condensação de cromatina, mas com a membrana citoplasmática ainda intacta; as células apoptóticas tardias apresentam fluorescência vermelho-alaranjada, devido à entrada de brometo de etídeo ou iodeto de propídeo, através da membrana citoplasmática danificada, e também evidenciam os grânulos característicos da condensação da cromatina; as

células necróticas se apresentam totalmente coradas em laranja, indicando perda da integridade da membrana, e não apresentam grânulos na região nuclear (Pellegrini et al. 2008).

Estão disponíveis também kits comerciais para detecção da ativação das caspases por citometria de fluxo e para detecção da perda de potencial mitocondrial intermembrana, também por citometria de fluxo ou por microscopia de epifluorescência (Mollet et al. 2007)

A morte celular por autofagia pode ser avaliada pela observação/identificação por microscopia eletrônica de transmissão de vacúolos citoplasmáticos com membrana dupla, característicos de células autofágicas (Barth et al. 2010). Ensaios de *western blot* e citometria de fluxo também podem ser utilizados para identificar marcadores moleculares, como a proteína LC3B-II, presentes em células em processo de autofagia (Lee e Lee, 2012)

1.6. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de analisar simultaneamente vários parâmetros biológicos ou físico-químicos de milhares de células e partículas em suspensão. As células ou partículas são interceptadas individualmente por um ou mais feixes de laser com comprimento de onda definido. O espalhamento de luz e sinais de fluorescência emitidos pela partícula são detectados e analisados, gerando informações sobre tamanho, complexidade, presença de marcadores de superfície, viabilidade celular, conteúdo intracelular, de acordo com uma infinidade de possíveis marcações que podem ser realizadas com moléculas que são excitadas pelos lasers e emitem fluorescência (Jaroszeski e Radcliff, 1999; Adan et al. 2017)

É possível identificar e caracterizar populações heterogêneas em um mesmo cultivo celular, bem como monitorar mudanças resultantes de alterações físicas e químicas no ambiente de cultivo. A citometria de fluxo auxilia tanto a fase de desenvolvimento de novos produtos, otimização de processos, quanto no monitoramento durante a produção de biofármacos, agregando informações importantes sobre a fisiologia celular a fim de compreender e prever a cinética do processo para um controle mais rigoroso e melhorias contínuas (Al-Rubeai et al. 1991; Sitton e Srienc, 2008).

Alguns trabalhos mostram a possibilidade de utilizar a técnica de citometria de fluxo de forma automatizada, permitindo um monitoramento em tempo real do cultivo. Tornando possível a ampliação do número de amostragens por período de cultivo e a eliminação do preparo manual das amostras, que envolve etapas de centrifugação, fixação, permeabilização e incubação com corantes (Kuystermans et al. 2012, 2016; Sitton e Srienc, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar o impacto do uso de uma bomba centrífuga com rotor acoplado magneticamente em uma corrente de recirculação de um biorreator de tanque agitado no desempenho do cultivo de células CHO-EPOhr.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as condições operacionais da bomba em uma linha de recirculação fechada;
- Verificar os efeitos da variação do parâmetro operacional velocidade da bomba sobre a fisiologia celular do cultivo em biorreator;
- Avaliar a influência da operação da bomba a longo prazo sobre o cultivo em biorreator, analisando a capacidade proliferativa, possíveis alterações no metabolismo celular e na produção da proteína de interesse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de Cultivo e Soluções

3.1.1. Meio de Cultivo

O meio de cultivo SFM4CHO-Utility (GE Healthcare HyClone™), contendo 3,8 g·L⁻¹ de glicose e suplementado com 2,2 g·L⁻¹ de NaHCO₃ (Merck Millipore) e 1,0 g·L⁻¹ de Pluronic F68 (Thermo Fischer Scientific), foi preparado em água para injetáveis. Posteriormente ao preparo, o meio foi esterilizado por filtração, com pressão negativa, em membrana com tamanho de poro de 0,22 µm. Após um período de teste de esterilidade de 24 horas a uma temperatura de 37 °C, o meio foi armazenado em refrigerador a 4 °C. No momento do uso, o meio foi suplementado com solução de L-Glutamina 200 mM para uma concentração final de 2 mM.

3.1.2. Meio de Congelamento

O meio de congelamento foi preparado no dia do procedimento de criopreservação celular, a partir de uma mistura de 91,5% v/v de meio de cultivo SFM4CHO-Utility, 1% v/v de solução de carboximetilcelulose a 3% p/v e 7,5% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). Após o preparo, o meio foi esterilizado por filtração em membrana com tamanho de poro de 0,22 µm e armazenado a 4 °C até o momento do uso.

3.1.3. Solução de L-Glutamina 200mM

A solução de L-Glutamina foi preparada com 29,23 g·L⁻¹ de L-Glutamina (Sigma Aldrich) em água para injetáveis. Posteriormente, a solução foi filtrada em membrana com tamanho de poro de 0,22 µm, aliqüotada em volumes de 20 mL e armazenada a -20 °C.

3.1.4. Solução de azul de tripano para coloração de células

A solução comercial de corante de azul de tripano a 0,4% (Thermo Fischer Scientific Gibco) foi utilizada na determinação da concentração e da viabilidade celular.

3.1.5. Solução de RNase A para ciclo celular

A solução estoque de RNase A ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi preparada em solução de acetato de sódio 10 mM pH 5,2. A solução foi aquecida a 100°C por 15 minutos, por não ser livre de DNase, e o pH foi ajustado para 7,4 com uma solução de Tris-HCl 1M pH 7,4. A solução para uso ($100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi preparada a partir da solução estoque em PBS.

3.1.6. Solução de iodeto de propídeo para ciclo celular

A solução foi preparada com iodeto de propídeo (Sigma Aldrich) na concentração final de $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, citrato de sódio (Merck) na concentração final de 4 mM e Triton X-100 na concentração final de 0,1% v/v, em água destilada, e armazenada a 4°C por até 1 mês.

3.1.7. Solução de iodeto de propídeo para viabilidade celular

A solução comercial com $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de iodeto de propídeo em água (Sigma Aldrich) foi utilizada para os ensaios de viabilidade celular por citometria de fluxo.

3.2. Linhagem celular

Foram utilizadas neste trabalho células recombinantes de ovário de hamster chinês (*Chinese Hamster Ovary* – CHO) expressando a molécula Eritropoetina Humana Recombinante (EPOhr), gentilmente cedidas pelo Centro de Imunologia Molecular (CIM, Cuba).

3.2.1. Descongelamento da linhagem celular

Uma ampola com 1 mL de suspensão celular, contendo aproximadamente $1 \cdot 10^7$ células, foi retirada do tanque de nitrogênio líquido e acondicionada, imediatamente, em um recipiente contendo água purificada a 37 °C. Assim que observado total descongelamento, o conteúdo da ampola foi retirado com auxílio de pipeta sorológica e transferido para um tubo cônico de centrífuga contendo 9 mL de meio de cultivo SFM4CHO-Utility suplementado com L-glutamina. Após homogeneização, uma alíquota foi retirada para determinação da concentração e viabilidade celular por azul de tripano. Apenas as ampolas com viabilidade superior a 80% foram utilizadas. A concentração celular foi ajustada para $3 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ com adição de meio de cultivo SFM4CHO-Utility suplementado com L-glutamina e a suspensão foi transferida para um frasco de cultivo tipo T75 e incubada em estufa a 37 °C.

3.2.2. Criopreservação da linhagem celular

Após determinação da concentração e viabilidade celular por azul de tripano, suspensão celular foi transferida para um tubo cônico e centrifugada por 10 minutos a 200 rcf. O sobrenadante foi descartado e o meio de congelamento foi acrescentado em volume suficiente para ajustar a concentração celular para $1 \cdot 10^7$ cel·mL⁻¹. A suspensão celular foi distribuída em ampolas (1 mL), acondicionadas no recipiente Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Fisher Scientific), contendo isopropanol. O mesmo foi armazenado em freezer -80 °C, para que o congelamento ocorra a uma taxa de - 1 °C·minuto⁻¹. Após 24 horas, as ampolas foram armazenadas em tanque de nitrogênio líquido a - 196 °C.

3.2.3. Manutenção e propagação da linhagem celular

Após o descongelamento, as células foram propagadas em frascos estáticos tipo T com superfícies de contato de 25, 75 e 175 cm², com concentração inicial de inóculo de $2 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹, em meio SFM4CHO-Utility suplementado com L- glutamina, e incubadas em estufa a 37 °C.

Posteriormente, a suspensão foi transferida para uma garrafa rotatória, com concentração inicial de inóculo de $2 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹, e incubada em estufa a 37 °C. As células foram cultivadas em suspensão, com auxílio de uma plataforma giratória. O volume de trabalho da garrafa rotatória variou de 100 a 300 mL, dependendo do procedimento seguinte. Após atingir o final da fase exponencial, a suspensão celular foi utilizada na confecção do banco de trabalho ou como inóculo do biorreator.

3.2.4. Confecção do banco de trabalho

As células utilizadas no presente trabalho são provenientes de um banco mestre criopreservado a -196 °C. Uma ampola foi descongelada, conforme descrito na seção 3.2.1. Após crescimento e determinação da concentração e viabilidade celular foi realizada expansão para uma garrafa rotatória com 300 mL de meio de cultivo. Após 3 dias de cultivo, foi realizada nova quantificação celular. A partir da suspensão celular com viabilidade superior a 90%, foram preparadas 30 ampolas, criopreservadas de acordo com o item 3.2.2.

3.3. Métodos Analíticos

3.3.1. Determinação da concentração e da viabilidade celular por azul de tripano

A determinação da concentração e da viabilidade celular foi realizada pela coloração por azul de tripano, com visualização em hemocítmetro ao microscópio óptico MPS 60® (Leica, Alemanha) com aumento de 100x. Um volume de 100 µL de suspensão celular foi acrescentado ao mesmo volume de solução de azul de tripano 0,4%, homogeneizado e, com auxílio de micropipeta, foi realizado o preenchimento da câmara. O corante vital penetra apenas em células que perderam a integridade da membrana, então foi possível contar células mortas coradas de azul e células viáveis que permaneceram incolores e refringentes, nos quatro quadrantes localizados nas extremidades da câmara, representados na Figura 3.1 (Louis e Siegel, 2011).

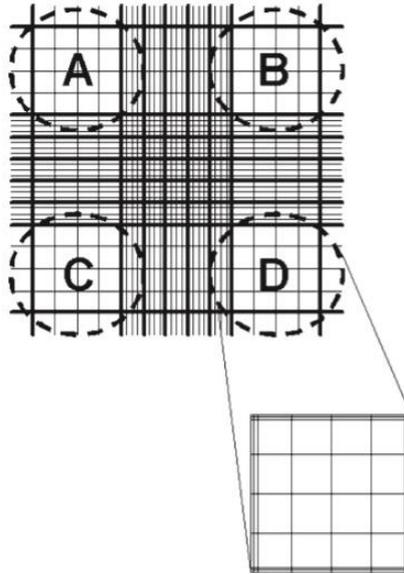


Figura 3.1. Representação dos quadrantes do hemocitômetro utilizados para contagem de células viáveis e células mortas coradas com azul de tripano. Fonte: Louis e Siegel, 2011.

O cálculo da concentração de células viáveis e células mortas levou em consideração a média de células nos quatro quadrantes, o fator de correção da câmara e o fator de diluição da amostra:

$$Xv \text{ ou } Xm = \frac{(A + B + C + D)}{4} \times 10^4 \times dil \quad (1)$$

Em que:

Xv = concentração de células viáveis

Xm = concentração de células mortas

$A + B + C + D$ = contagem de células respectiva aos quatro quadrantes do hemocitômetro

10^4 = fator de ajuste para mililitros

dil = fator de diluição da amostra

A concentração de células totais foi calculada pela soma da concentração de células viáveis e células mortas:

$$Xt = Xv + Xm \quad (2)$$

Em que:

Xt = concentração de células totais

A viabilidade celular foi dada pelo percentual de células viáveis em relação às células totais:

$$Viab = \frac{Xv}{Xt} \times 100 \quad (3)$$

Para o cálculo da concentração de células viáveis, após diluição do biorreator, foi realizado balanço de massas por meio da equação:

$$X_{vf} = \frac{X_{v0} \times V_0}{V_f} \quad (4)$$

Em que:

X_{v0} = concentração inicial de células viáveis

V_0 = volume inicial do biorreator

X_{vf} = concentração final de células viáveis

V_f = volume final do biorreator

A mesma equação (4) foi utilizada para o cálculo da concentração de células mortas e células totais, com a substituição da variável concentração inicial de células viáveis por concentração inicial de células mortas e concentração inicial de células totais, respectivamente.

O cálculo da taxa específica de crescimento aparente foi feito em intervalos da curva de crescimento, levando em consideração a concentração de células viáveis e o tempo decorrido durante cada intervalo, utilizando a seguinte equação:

$$\frac{dXv}{dt} = \mu_{ap} Xv \quad \approx \quad \mu_{ap} = \frac{\ln(Xv_2) - \ln(Xv_1)}{\Delta t} \quad (5)$$

Em que:

Xv = concentração de células viáveis

$\ln(Xv_1)$ e $\ln(Xv_2)$ = logaritmos naturais das concentrações de células viáveis nos pontos que delimitam o intervalo considerado

Δt = intervalo de tempo analisado

μ_{ap} = taxa específica de crescimento aparente

Nos casos em que a viabilidade celular é alta, é possível calcular a taxa específica de crescimento levando em consideração as células totais, dividindo o valor do μ_{ap} pela viabilidade celular.

$$\mu = \frac{\mu_{ap}}{viab} \quad (6)$$

Em que:

μ = taxa específica de crescimento

$viab$ = viabilidade celular

O tempo de duplicação foi calculado a partir de uma variação da mesma equação, que utiliza o resultado encontrado para a taxa específica de crescimento para determinar o intervalo de tempo em que a concentração celular duplica.

$$td = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu} \quad (7)$$

Em que:

td = tempo de duplicação

$\text{Ln}(2)$ = logaritmo natural de 2

3.3.2. Dosagem de nutrientes e metabólitos

A concentração de glicose presente no sobrenadante celular, das amostras coletadas durante as corridas do biorreator, foi medida com o glicosímetro comercial Accu Check® Active (Roche, Alemanha). Alíquotas de 1 mL de sobrenadante foram armazenadas a -20°C para posteriores dosagens de glicose e lactato no analisador bioquímico YSI 2700 Select Analyzer (Yellow Springs Instruments Inc., EUA), que utiliza membranas com enzimas imobilizadas (glicose oxidase para avaliação de glicose e lactato oxidase para avaliação de lactato), que ao entrar em contato com a amostra geram peróxido de hidrogênio, como subproduto da reação. O peróxido de hidrogênio é oxidado em um anodo de platina e gera um fluxo de elétrons. Devido a proporcionalidade da formação dos subprodutos é possível estimar as concentrações de glicose e lactato.

Para os casos onde não foi realizada amostragem após a diluição do biorreator, os cálculos das concentrações de glicose e lactato foram feitos por balanço de massas, de acordo com as equações:

$$GLC_2 = \frac{(GLC_1 \times V_1) + (GLC_m \times V_m)}{V_2} \quad (8)$$

Em que:

GLC_2 = concentração final de glicose

GLC_1 = concentração de glicose na suspensão celular

V_1 = volume de suspensão celular que permaneceu no biorreator

GLC_m = concentração de glicose no meio de cultivo adicionado

V_m = volume de meio de cultivo adicionado ao biorreator

V_2 = volume final do biorreator

$$LAC_2 = \frac{(LAC_1 \times V_1)}{V_2} \quad (9)$$

Em que:

LAC_2 = concentração final de lactato

LAC_1 = concentração de lactato na suspensão celular

V_1 = volume de suspensão celular que permaneceu no biorreator

V_2 = volume final do biorreator

Para o cálculo da taxa específica de consumo de glicose ($q_{[GLC]}$) ou produção de lactato ($q_{[LAC]}$), em um determinado intervalo de tempo, foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{di}{dt} = q_{[i]} \cdot X_v \approx \frac{\Delta i}{\Delta t} = q_{[i]} \cdot \bar{X}_v \quad (10)$$

Em que:

i = GLC ou LAC

$q_{[i]}$ = taxa específica de consumo ou produção

Δi = variação da concentração no intervalo de tempo Δt

Δ_t = intervalo de tempo analisado

\bar{X}_v = média da concentração de células viáveis no intervalo de tempo Δ_t

Para o cálculo do fator de conversão de glicose em lactato, em um determinado intervalo de tempo, foi utilizada a seguinte equação:

$$Y_{[LAC]/[GLC]} = \frac{\Delta LAC}{-\Delta GLC} \quad (11)$$

Em que:

$Y_{[LAC]/[GLC]}$ = fator de conversão de glicose em lactato

ΔLAC = variação da concentração de lactato no intervalo de tempo Δ_t

$-\Delta GLC$ = consumo de glicose no intervalo de tempo Δ_t

3.3.3. Análise da produção de EPOhr

A quantificação da proteína recombinante EPOhr foi realizada, a partir do sobrenadante armazenado a -20°C , por meio de um ensaio imunoenzimático tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Foi utilizado o kit comercial de ELISA tipo sanduíche Quantikine®IVD®ELISA (R&D Systems, EUA), e o ensaio foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Dois anticorpos reconhecem a proteína de interesse: o anticorpo de captura já vem imobilizado na placa de 96 poços e o anticorpo de detecção é adicionado posteriormente à incubação com a amostra. O anticorpo de detecção é conjugado à enzima *horseradish peroxidase* (HRP). A enzima catalisa a degradação do substrato peróxido de hidrogênio, e as espécies reativas de oxigênio formadas oxidam a tetrametilbenzidina, composto adicionado que sofre alteração de cor. A reação é interrompida após 25 minutos com a adição de ácido sulfúrico. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro modelo xMark™ (Bio-Rad, EUA) com comprimento de onda de 450 nm e correção em 600 nm. A curva padrão (7 pontos) com concentrações de EPO variando entre 0 e $200 \text{ mUI} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi calculada por um modelo de regressão não linear de quatro parâmetros (4PL) com o software de leitura e análise Microplate Manager Software 6.3 (Bio-Rad, EUA). O ensaio foi realizado com 3 diluições de cada amostra (1/20.000, 1/40.000 e 1/80.000). A curva padrão e as amostras foram analisadas em duplicata.

Para o cálculo da taxa específica de produção de EPOhr ($q_{[EPOhr]}$), em um determinado intervalo de tempo, foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{dEPOhr}{dt} = q_{[EPOhr]} \cdot X_v \approx \frac{\Delta EPOhr}{\Delta t} = q_{[EPOhr]} \cdot \overline{X}_v \quad (12)$$

Em que:

$q_{[EPOhr]}$ = taxa específica de produção de EPOhr

$\Delta EPOhr$ = variação da concentração de EPOhr intervalo de tempo Δt

Δt = intervalo de tempo analisado

\overline{X}_v = média da concentração de células viáveis intervalo de tempo Δt

3.3.4. Análise da concentração de proteína da célula hospedeira (HCP) no sobrenadante

A concentração de proteínas características de células CHO no sobrenadante celular foi avaliada por um ensaio imunoenzimático tipo ELISA, com o objetivo de correlacionar um possível aumento na concentração dessas proteínas com a lise celular. O kit comercial *Chinese Hamster Ovary Host Cell Proteins* (Cygnus Technologies, EUA) é indicado para a identificação e quantificação de contaminação de produtos biotecnológicos que utilizam células CHO como sistema hospedeiro. Foi feita uma adaptação para o uso com sobrenadante celular, por meio da diluição amostras (1/10) em PBS.

Assim como o kit de detecção de EPO, o kit para detecção de HCP também consiste de um ELISA tipo sanduíche, com o anticorpo de captura imobilizado na placa de 96 poços e o anticorpo de detecção conjugado com a enzima fosfatase alcalina. O substrato utilizado para reação colorimétrica é o p-nitrofenilfosfato. O protocolo rápido (com agitação da placa) fornecido pelo fabricante foi seguido e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro modelo xMark™ (Bio-Rad, EUA) com comprimento de onda de 405 nm e correção em 492 nm. A curva padrão (5 pontos) com concentração de HCP variando entre 0 e 250 ng·mL⁻¹ foi calculada por interpolação do tipo *spline* cúbica com o software de leitura e análise Microplate Manager Software 6.3 (Bio-Rad, EUA). A curva padrão e as amostras foram analisadas em duplicata.

3.3.5. Análises por citometria de fluxo

Os ensaios foram realizados na Plataforma de Citometria de Fluxo da Fiocruz no Rio de Janeiro, com o citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, EUA), utilizando laser de argônio (488 nm) e os canais de leitura com filtros de 585/42 nm e 690/50 nm. A análise dos dados foi feita com o software CytExpert versão 1.2.11.0 (Beckman Coulter, EUA).

3.5.5.1. Viabilidade celular

Ensaio de viabilidade celular, com amostras provenientes dos testes com a bomba PuraLev® 200MU, foram realizados utilizando o corante fluorescente iodeto de propídeo (PI). O corante é um intercalante de ácidos nucleicos, que penetra nas células apenas quando a membrana plasmática perde a integridade, tornando possível distinguir células viáveis e células mortas.

O volume de 500 µL de suspensão celular foi centrifugado (200 rcf por 5 min) e 500 µL de PBS foram adicionados ao sedimento celular. Foram acrescentados 5 µL da solução 10 mg·mL⁻¹ de iodeto de propídeo ao microtubo, que foi incubado por 5 minutos em banho de gelo, protegido da luz. As amostras foram lidas no canal com filtro de 585/42 nm, com aquisição de 20.000 eventos por amostra.

3.5.5.2. Ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada com células fixadas e permeabilizadas, tratadas com RNase e coradas com iodeto de propídeo. Desta forma, o conteúdo de DNA de cada célula pode ser avaliado quanto à intensidade de fluorescência, sendo possível distinguir as fases do ciclo celular em que a célula se encontra (G0/G1; S; G2/M).

O volume de 1 mL de suspensão celular foi centrifugado (200 rcf por 5 min) e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado às células sedimentadas. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a amostra foi armazenada a - 20°C.

No dia da análise, as amostras foram descongeladas e centrifugadas (1000 rcf por 10 min). Após adição de 1 mL de PBS ao sedimento celular, foi realizada nova centrifugação (1000 rcf por 10 min). Foram adicionados 50 µL da solução de RNase às células e a suspensão foi incubada a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL da solução de iodeto de propídeo preparada para o ensaio de ciclo celular e a amostra foi incubada no gelo por 10 minutos. A amostras foram lidas no canal com filtro de 585/42 nm, com aquisição de 20.000 eventos por amostra.

3.5.5.3. Apoptose

A detecção de apoptose por citometria de fluxo foi realizada com kit comercial *PE Annexin V Apoptosis Detection* (BD Pharmingen) que utiliza o princípio de marcação da fosfatidilserina com anexina V conjugada com o corante ficoeritrina (PE). A fosfatidilserina é um fosfolípídeo presente apenas na face interna da membrana celular de células viáveis, que transloca para a face externa da membrana de células em processo de apoptose. A distinção de células em processo de necrose ou apoptose tardia de células na fase de apoptose inicial é feita por marcação com intercalante de DNA 7-aminoactinomicina D (7AAD), que penetra por membranas que perderam a integridade (Butler et al, 2014).

Foram utilizadas 4 alíquotas de 500 µL de suspensão celular para cada teste. As amostras foram centrifugadas (200 rcf por 5 min) e 500 µL de PBS foram adicionados às células. Após nova centrifugação (200 rcf por 5 min), foram adicionados 100 µL do tampão fornecido pelo kit em cada tubo. O primeiro tubo não recebeu nenhum corante, ao segundo foram adicionados 2,5 µL de 7AAD, o terceiro recebeu 2,5 µL de anexina conjugada à ficoeritrina e o quarto tubo recebeu 2,5 µL de cada corante. Os tubos foram incubados no escuro, à temperatura ambiente, por 15 minutos. A cada tubo foram adicionados 400 µL de tampão do kit, e a leitura no citômetro de fluxo foi realizada nos canais com filtros de 585/42 nm e 690/50 nm.

Foram realizados testes com cultivos celulares em frasco T25 incubados com a droga pró-apoptótica cisplatina. Diferentes tempos de incubação e concentrações da droga foram testados com o objetivo de obter um controle positivo para os ensaios de apoptose.

3.4. Sistema de cultivo em biorreator com recirculação da suspensão celular

3.4.1. Montagem do circuito de recirculação com a bomba PuraLev® 200MU

O circuito foi montado a partir da conexão de uma bomba centrífuga com impelidor de acoplamento magnético à linha de recirculação de um biorreator de 2 L de escala laboratorial (Figura 3.2).

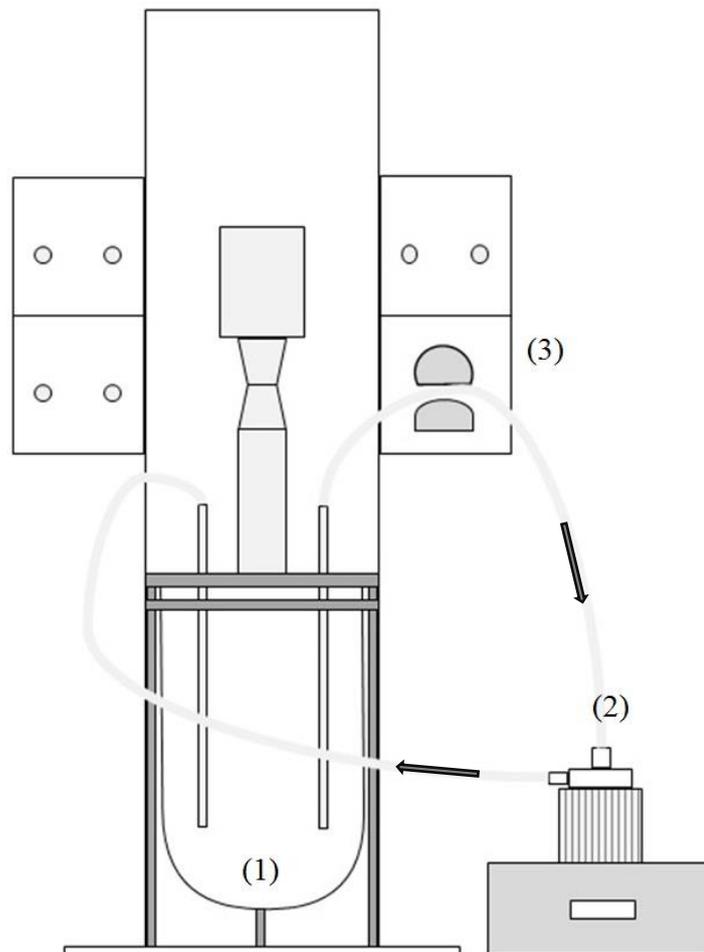


Figura 3.2. Esquema do sistema de recirculação celular. (1) Vaso do biorreator (2) Bomba PuraLev® 200MU. (3) Bomba peristáltica.

O biorreator, do tipo tanque agitado modelo RALF Plus (Bioengineering, Suíça), dispõe de sensores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura, além de controles de agitação, temperatura, injeção de gases e adição de soluções. A bomba, modelo PuraLev® 200MU (Levitronix, Suíça), possui capacidade de recirculação de

21 L·min⁻¹, a 10.000 revoluções por minuto (rpm) e a uma pressão máxima de 2,4 bar. A representação esquemática dos componentes da bomba se encontra na Figura 3.3.

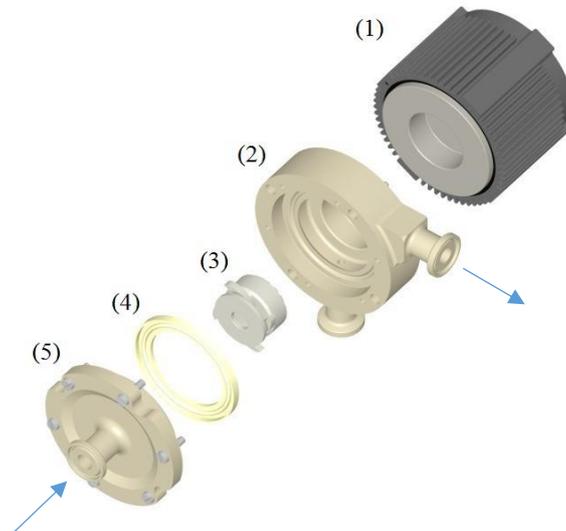


Figura 3.3. Bomba centrífuga com impelidor magnético PuraLev® 200MU. (1) Motor (2) Parte inferior da câmara da bomba (3) Impelidor magnético (4) Anel de vedação (5) Parte superior da câmara da bomba. As setas indicam o sentido do fluido bombeado. Fonte: Levitronix, 2016.

3.4.2. Calibração do circuito de recirculação com a bomba PuraLev® 200MU

Após a montagem do circuito e a definição da melhor configuração, a vazão da bomba PuraLev® 200MU foi avaliada de acordo com a velocidade de rotação indicada no painel de controle, verificando-se a linearidade da correlação dessas variáveis dependentes.

Para isso, a mangueira de entrada da bomba foi conectada ao biorreator, cujo vaso foi preenchido com água, e a mangueira de saída da bomba permaneceu livre, para que o fluxo de água fosse direcionado a uma proveta de 2000 mL e fosse feita a medição do volume bombeado, como representado na Figura 3.4. Foram avaliadas velocidades de 1000, 2000 e 3000 rpm, com tempos de recirculação respectivamente definidos em 40, 40 e 20 segundos.

A equação abaixo foi utilizada para o cálculo da vazão volumétrica:

$$Q_v = \frac{V}{t} \quad (13)$$

Na qual Q_v é a vazão volumétrica, V é o volume de líquido escoado e t o tempo de escoamento.

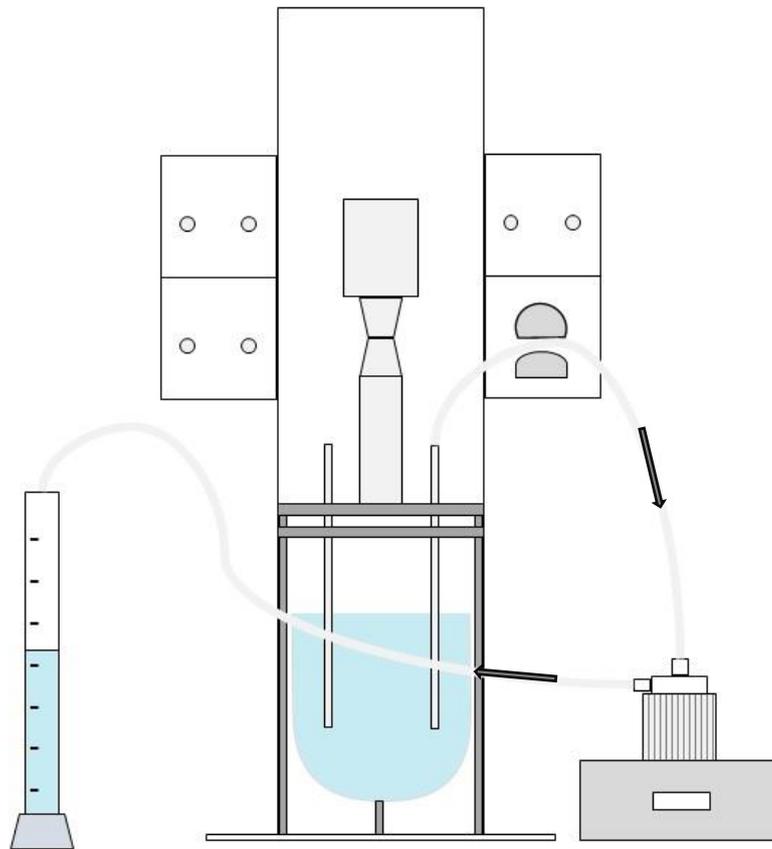


Figura 3.4. Esquema representativo do teste de calibração do circuito de recirculação.

3.4.3. Montagem e esterilização do biorreator com circuito de recirculação

Os sensores e as portas de entrada e saída foram posicionados na tampa do vaso do biorreator conforme a Figura 3.5. A câmara de bombeamento da bomba centrífuga (desacoplada do motor) foi conectada às mangueiras de entrada e saída ligadas ao biorreator. O vaso do biorreator foi preenchido com tampão fosfato salino pH 7,5 e o sistema foi autoclavado a 121°C por 1 hora.

Após a conexão do sistema de cultivo autoclavado à base de controle do biorreator e o reposicionamento do motor da bomba, o tampão fosfato salino foi drenado, com o auxílio da bomba peristáltica, para um frasco acessório conectado à porta 5. O meio de cultivo SFM4CHO-Utility suplementado com NaCO₃ e Pluronic F68 foi transferido para o vaso do biorreator por meio da porta 2. A cavidade da bomba PuraLev® 200MU foi preenchida com o meio de cultivo, com a utilização da bomba peristáltica. A bomba PuraLev® 200MU foi acionada durante um período de 5 minutos,

a uma velocidade de 2000 rpm, e o meio permaneceu a 37°C por 48 h para teste de estanqueidade.

Os procedimentos de montagem, esterilização, preenchimento da cavidade da bomba PuraLev® 200MU e teste de estanqueidade foram repetidos para todas as corridas do biorreator com recirculação da suspensão celular.

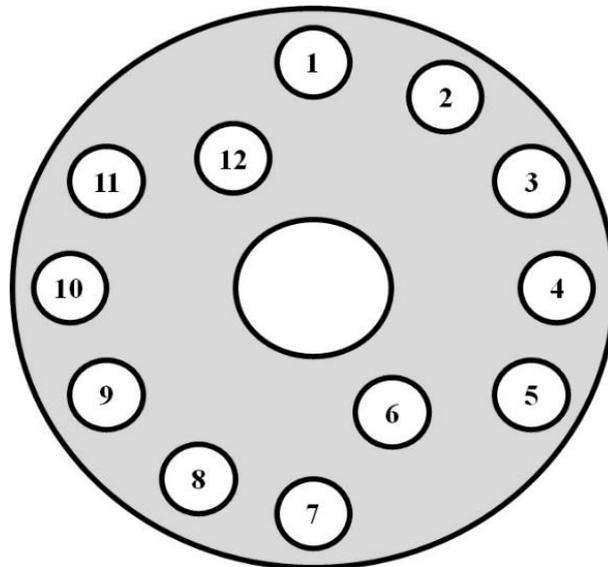


Figura 3.5. Vista superior da tampa do vaso do biorreator com posicionamento de sensores e portas. (1) Sensor de temperatura (2) Entrada de meio de cultivo (3) Condensador (4) Entrada da bomba PuraLev® 200MU (5) Mangueira de retirada de líquido (6) Sensor de nível (7) Porta não utilizada (8) Sensor de oxigênio (9) Saída da bomba PuraLev® 200MU (10) Amostrador (11) Aspensor (12) Sonda de pH.

3.4.4. Teste do circuito de recirculação nas velocidades de 1000, 2000 e 3000 rpm

Após a montagem e esterilização do biorreator com circuito de recirculação, adição de meio de cultivo e teste de estanqueidade, foi realizado inóculo de células CHO provenientes do cultivo em garrafas rotatórias (como descrito no item 3.2.3) na concentração celular inicial de $2,0 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹, com volume final na faixa de 1700 a 2000 mL. A solução de L-glutamina foi adicionada junto com o inóculo (concentração final 2 mM).

As células foram cultivadas por 72h até o início do teste da bomba PuraLev® 200MU. A temperatura foi mantida a 37°C, por meio de sistema de encamisamento com água. O pH foi programado para 7,1 e controlado apenas por injeção de CO₂. A aeração foi realizada por microborbulhamento e o oxigênio dissolvido (OD) foi mantido

em 50% da saturação com ar. A agitação foi programada para 150 rpm com impelidor de 4 pás inclinadas.

Para o teste da bomba PuraLev® 200MU em escala laboratorial, foi levada em consideração a taxa de perfusão utilizada no processo de produção da eritropoetina humana recombinante, que recircula diariamente 20 vezes o volume de suspensão do biorreator de acordo com dados cedidos pelo parceiro tecnológico (Centro de Imunologia Molecular, Cuba). A mesma célula, portanto, estaria exposta a 20 interações diárias com o dispositivo de retenção celular e com o sistema de bombeamento, considerando um sistema de mistura perfeita. Desta forma, a bomba permaneceu ligada por tempo suficiente para que todo o volume do biorreator passasse pela câmara de bombeamento 20 vezes. O tempo de acionamento para cada velocidade foi calculado a partir da curva de calibração da bomba (Tabela 3.1). As velocidades de 1000, 2000 e 3000 rpm foram testadas em três diferentes corridas do biorreator.

Tabela 3.1. Tempo de atuação da bomba PuraLev® 200MU em cada teste.

Velocidade (rpm)	Tempo (min)
1000	55
2000	18
3000	13

Após o desligamento da bomba PuraLev® 200MU, as mangueiras do circuito de recirculação foram grampeadas. Amostragens diárias foram realizadas para o monitoramento do cultivo, desde o dia do inóculo. No dia em que a bomba foi testada, o monitoramento foi realizado antes da recirculação, imediatamente após e 2 horas depois do teste. Determinou-se a concentração e viabilidade celular, bem como a concentração de glicose presente no meio de cultivo. Alíquotas das amostras foram armazenadas a -20 °C para análises posteriores, como verificação da concentração de lactato.

Foi realizada troca parcial do meio de cultivo 24h e 48h após o teste com a bomba, com o objetivo de manter a concentração de células viáveis em torno de $10 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e evitar que a privação de nutrientes ou o acúmulo de metabólitos interferissem na proliferação e na viabilidade celular.

3.4.5. Operação contínua do circuito de recirculação

3.4.5.1. Teste de recirculação contínua I

As etapas de montagem do biorreator com circuito de recirculação, esterilização, adição de meio de cultivo e teste de estanqueidade foram executadas conforme descrito no item 3.4.3.

Foi realizado inóculo de células CHO provenientes do cultivo em garrafas rotatórias (como descrito no item 3.2.3) na concentração celular inicial de $2,0 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹, com volume final de aproximadamente 2000 mL. Junto com o inóculo, também foi adicionada ao biorreator a solução de L-glutamina (concentração final 2 mM).

A temperatura foi mantida a 37°C, por meio de sistema de encamisamento com água. O pH foi programado para 7,1 e controlado apenas por injeção de CO₂. A aeração foi realizada por microborbulhamento e o oxigênio dissolvido (OD) foi mantido em 50% da saturação de ar. A agitação foi programada para 150 rpm com impelidor de 4 pás inclinadas.

A bomba PuraLev® 200MU foi acionada 48 horas após o inóculo, com a velocidade de 1000 rpm, que foi mantida por 7 dias consecutivos. A velocidade foi reajustada para 2000 rpm e a bomba permaneceu ligada por mais 6 dias.

Neste experimento, a troca parcial de meio de cultivo começou 72h após o inóculo, com taxas de diluição variando entre 0,45 e 0,55. Os cálculos para diluição do biorreator levaram em consideração a concentração de glicose no sobrenadante, onde, a concentração de glicose era elevada diariamente até 2,5 g·L⁻¹, mediante retirada de suspensão celular do biorreator e adição de meio de cultivo suplementado com L-glutamina.

Duas amostragens diárias foram realizadas, antes e após a diluição do biorreator. Além da verificação da concentração de glicose no sobrenadante, da concentração e da viabilidade celular por microscopia com azul de tripano, alíquotas de cada amostra foram armazenadas a -20°C para dosagens de proteínas de célula CHO, concentração de EPOhr e concentração de glicose e lactato.

3.4.5.2. Teste de recirculação contínua II

As etapas de montagem do biorreator com circuito de recirculação, esterilização, adição de meio de cultivo e teste de estanqueidade foram executadas conforme descrito no item 3.4.3.

Foi realizado inóculo de células CHO provenientes do cultivo em garrafas rotatórias (como descrito no item 3.2.3) na concentração celular inicial de $2,0 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, com volume final de aproximadamente 2000 mL. Junto com o inóculo, também foi adicionada ao biorreator a solução de L-glutamina (concentração final 2 mM).

A temperatura foi mantida a 37°C , por meio de sistema de encamisamento com água. O pH foi programado para 7,1 e controlado apenas por injeção de CO_2 . A aeração foi realizada por microborbulhamento e o oxigênio dissolvido (OD) foi mantido em 50% da saturação de ar. A agitação foi programada para 150 rpm com impelidor de 4 pás inclinadas.

A bomba PuraLev® 200MU foi acionada 240 horas após o inóculo, com a velocidade de 1000 rpm, que foi mantida por 48 horas.

Neste experimento, a troca parcial de meio de cultivo começou 72h após o inóculo, com taxas de diluição variando entre 0,5 e 0,7. Os cálculos para diluição do biorreator levaram em consideração a concentração de glicose no sobrenadante, onde, a concentração de glicose era elevada diariamente até $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, mediante retirada de suspensão celular do biorreator e adição de meio de cultivo suplementado com L-glutamina.

Duas amostragens diárias foram realizadas, antes e após a diluição do biorreator. Foi realizada verificação da concentração de glicose no sobrenadante, quantificação celular por microscopia com azul de tripano e avaliação por citometria de fluxo (apenas em algumas amostragens). Alíquotas de cada amostra foram armazenadas a -20°C para dosagens de proteínas de célula CHO, concentração de EPOhr, ciclo celular por citometria de fluxo e concentração de glicose e lactato.

3.5. Sistema de cultivo em biorreator sem recirculação de suspensão celular

A montagem do biorreator seguiu as mesmas diretrizes do item 3.4.3, eliminando apenas as portas de entrada e saída da bomba, sendo substituídas por tampões cegos.

Foi realizado inóculo de células CHO provenientes do cultivo em garrafas rotatórias (como descrito no item 3.2.3) na concentração celular inicial de $2 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, com volume final de aproximadamente 2000 mL. Junto com o inóculo, também foi adicionada ao biorreator a solução de L-glutamina (concentração final 2 mM).

A temperatura foi mantida a 37°C , por meio de sistema de encamisamento com água. O pH foi programado para 7,1 e controlado apenas por injeção de CO_2 . A aeração foi realizada por microborbulhamento e o oxigênio dissolvido (OD) foi mantido em 50% da saturação de ar. A agitação foi programada para 150 rpm com impelidor de 4 pás inclinadas.

As trocas de meio de cultivo diárias foram iniciadas 72h após o inóculo, e o cálculo para diluição foi visando a manutenção da concentração de células viáveis em torno de $10 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. Foi realizado monitoramento diário do cultivo, com quantificação celular por microscopia com azul de tripano e dosagem de glicose no sobrenadante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação das condições operacionais da bomba PuraLev® 200MU em uma linha de recirculação fechada

As condições operacionais da bomba PuraLev® 200MU em escala laboratorial foram avaliadas após a montagem do circuito de recirculação. O sistema foi configurado a partir da conexão da bomba centrífuga PuraLev® 200MU (Levitronix, Suíça) à linha de recirculação do biorreator de 2 L RALF Plus (Bioengineering, Suíça). A posição da bomba foi definida, de modo que o sistema apresentasse sempre a mesma configuração, já que a vazão da bomba é alterada quando a mesma é posicionada em alturas diferentes, devido à perda de carga sofrida pela coluna de líquido na tubulação. A bomba PuraLev® 200MU não é autoescorvante, por esse motivo foi necessário utilizar uma bomba peristáltica para o preenchimento da cavidade da bomba centrífuga e mangueiras acessórias com líquido. Caso o biorreator possuísse um vaso com saída na parte inferior, o preenchimento poderia ser feito apenas por sistema de vasos comunicantes, sem necessidade da bomba peristáltica.

As velocidades de operação testadas neste trabalho (1000, 2000 e 3000 rpm) foram definidas de acordo com a compatibilidade com o sistema de biorreação de 2 L. Velocidades inferiores à 1000 rpm não foram capazes de promover a recirculação do líquido no sistema, enquanto velocidades superiores à 3000 rpm criaram um ambiente hidrodinâmico muito turbulento no interior do vaso. As vazões obtidas durante a calibração do circuito estão dispostas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Dados do teste de calibração do sistema de recirculação. As vazões foram calculadas a partir da medição de volumes bombeados a diferentes velocidades, por tempos pré-definidos.

Velocidade (rpm)	Tempo (s)	Volume (L)	Vazão (L·min ⁻¹)
1000	40	0,46±0,01	0,69±0,01
2000	40	1,28±0,02	1,92±0,03
3000	20	1,04±0,03	3,17±0,11

A curva de calibração, na Figura 4.1, apresenta a correlação entre a velocidade determinada pelo controlador da bomba e a vazão efetiva de fluido bombeado, na configuração em que o sistema de recirculação foi montado. A correlação se mostrou linear, com $R^2=0,9975$, tornando possível a escolha de qualquer velocidade dentro do intervalo testado, sem a necessidade da verificação da vazão para cada uma delas.

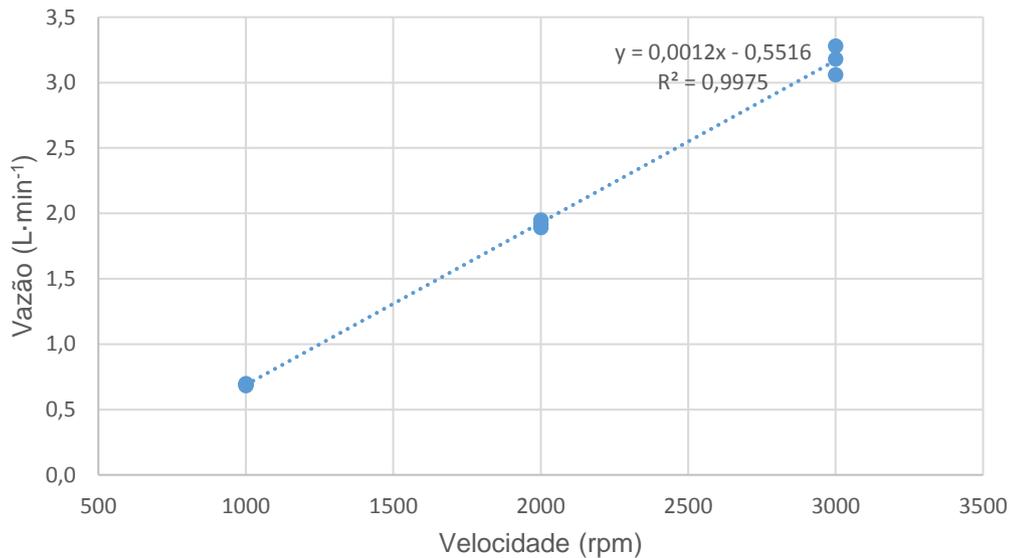


Figura 4. 1. Curva de calibração da bomba PuraLev® 200MU.

4.2. Avaliação dos efeitos da variação da velocidade da bomba sobre a fisiologia celular do cultivo

Foram realizados testes com o circuito de recirculação nas velocidades de 1000, 2000 e 3000 rpm, com a utilização de células CHO em suspensão. O cultivo foi monitorado e os efeitos sobre a fisiologia celular foram avaliados.

Uma cinética de crescimento celular em batelada realizada no biorreator RALF Plus, previamente a este trabalho, foi utilizada como base para o planejamento dos experimentos com o circuito de recirculação. Os dados da cinética em batelada encontram-se nas Tabelas 4.2 e 4.3 e nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4.

As primeiras 23 horas mostram um período de adaptação das células ao cultivo (fase *lag*), com alta viabilidade celular, em torno de 95%, e tempo de duplicação (T_d) de 34,5 horas (Figura 4.2 e Tabela 4.3). Entre 23 e 73 horas de cultivo, as células se encontram na fase exponencial de crescimento, na qual a viabilidade se mantém alta e o tempo de duplicação diminui, chegando a 20,6 h. A taxa específica de

crescimento (μ) chega a $0,034 \text{ h}^{-1}$ e a concentração de células viáveis alcança $13,8 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$.

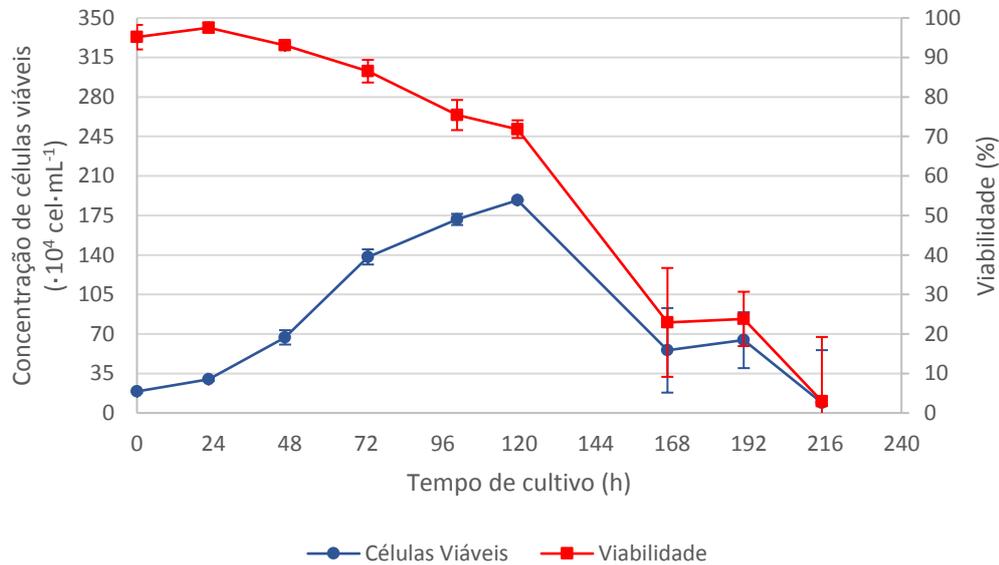


Figura 4.2. Curva de crescimento e viabilidade celular da cinética em batelada no biorreator RALF Plus.

Tabela 4.2. Dados da cinética de crescimento em batelada no biorreator RALF Plus.

Tempo de cultivo (h)	Células Viáveis ($\cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Células Mortas ($\cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Células Totais ($\cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Viabilidade (%)	Glicose YSI ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Lactato YSI ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	EPOhr ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0	19,0 \pm 1,1	1,0 \pm 0,7	20,0 \pm 1,8	95,1	3,24	0,15	0,0 \pm 0,2
23	29,9 \pm 1,6	0,8 \pm 0,4	30,7 \pm 1,2	97,5	2,94	0,36	2,5 \pm 0,4
47	67,0 \pm 6,4	5,0 \pm 0,0	72,0 \pm 6,4	93,0	2,60	0,70	6,4 \pm 0,1
73	138,2 \pm 6,7	21,5 \pm 4,2	159,7 \pm 2,5	86,5	1,98	0,97	14,1 \pm 0,1
101	171,5 \pm 5,0	56,0 \pm 9,0	227,5 \pm 5,0	75,4	1,44	1,10	25,0 \pm 1,1
120	188,5 \pm 0,7	74,0 \pm 8,5	262,5 \pm 9,2	71,8	1,10	1,16	22,5 \pm 1,5
167	55,5 \pm 37,5	180,0 \pm 15,6	235,5 \pm 21,9	22,9	0,48	1,25	44,9 \pm 2,9
190	64,5 \pm 24,8	202,5 \pm 2,1	267,0 \pm 26,9	23,8	0,27	1,28	51,9 \pm 1,8
215	9,0 \pm 46,7	277,0 \pm 41,0	286,0 \pm 5,7	3,0	0,13	1,29	65,1 \pm 7,4

Entre 73 e 120 horas, a taxa específica de crescimento cai para faixa de $0,005 \text{ h}^{-1}$ a $0,008 \text{ h}^{-1}$, assim como a viabilidade, que cai de 86,5% para 71,8%. Neste período, a concentração de células viáveis apresentou elevação relativamente

constante, apesar de se tratar da fase estacionária, e alcançou a concentração máxima de $1,89 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. Apesar do crescimento durante esta fase, houve um equilíbrio entre o aumento da concentração de células mortas e de células viáveis, fenômeno característico da fase estacionária do cultivo.

A partir de 120 horas de cultivo, já se inicia a fase de declínio, na qual a taxa de crescimento não supera a taxa de morte, devido à privação de nutrientes e excesso de metabólitos tóxicos. Diversos trabalhos demonstram que o acúmulo de metabólitos gerados pelas células, como lactato e amônia, pode modificar a osmolalidade e reduzir o pH do meio de cultivo, afetando a viabilidade celular (Lao e Toth, 1997; Cruz et al, 2000).

Tabela 4.3. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética de crescimento em batelada no biorreator RALF Plus.

Intervalo de tempo (h)	μ (h^{-1})	Td (h)	$q_{[GLC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol-cel $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$q_{[LAC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol-cel $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Y_{[LAC]/[GLC]}$ (mmol·mmol $^{-1}$)	$q_{[EPOhr]}$ (pg-cel $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
0-23	0,020	34,5	3,1	4,4	1,42	0,46
23-47	0,034	20,6	1,6	3,2	1,98	0,33
47-73	0,028	24,9	1,3	1,1	0,88	0,29
73-101	0,008	90,1	0,7	0,3	0,48	0,25
101-120	0,005	139,3	0,6	0,2	0,35	-0,07
120-167	-0,026	-26,6	0,6	0,2	0,27	0,39
167-190	0,006	110,7	0,8	0,3	0,34	0,49
190-215	-0,080	-8,6	0,9	0,1	0,07	1,47

A concentração inicial de glicose no biorreator foi de $3,24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e ao longo do cultivo foi observada queda resultante do consumo pelo metabolismo celular. No período entre 73 e 120 horas, quando a viabilidade celular começa a ser afetada, a concentração de glicose encontra-se na faixa de 1 a $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. A concentração de lactato no meio de cultivo varia de 0,15 a $0,97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nos três primeiros dias de cultivo. A partir do quarto dia, entra em um platô e assim permanece até o final do cultivo, com concentração máxima de $1,29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 4.3). Este fenômeno é observado também nos valores fator de conversão da glicose em lactato, que ficaram na faixa de 0,27 – 0,48 mmol·mmol $^{-1}$.

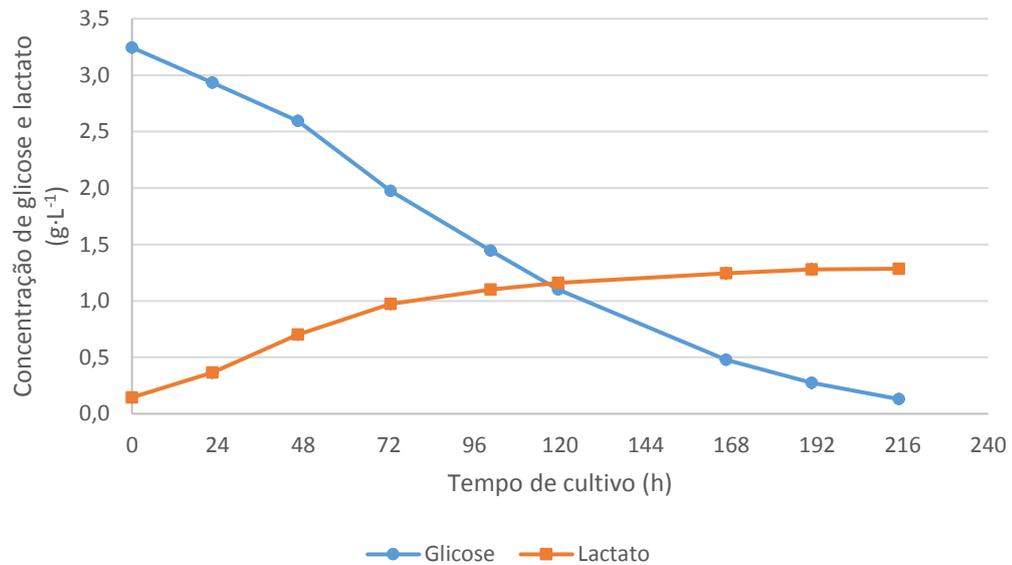


Figura 4.3. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo celular da cinética em batelada no biorreator RALF Plus.

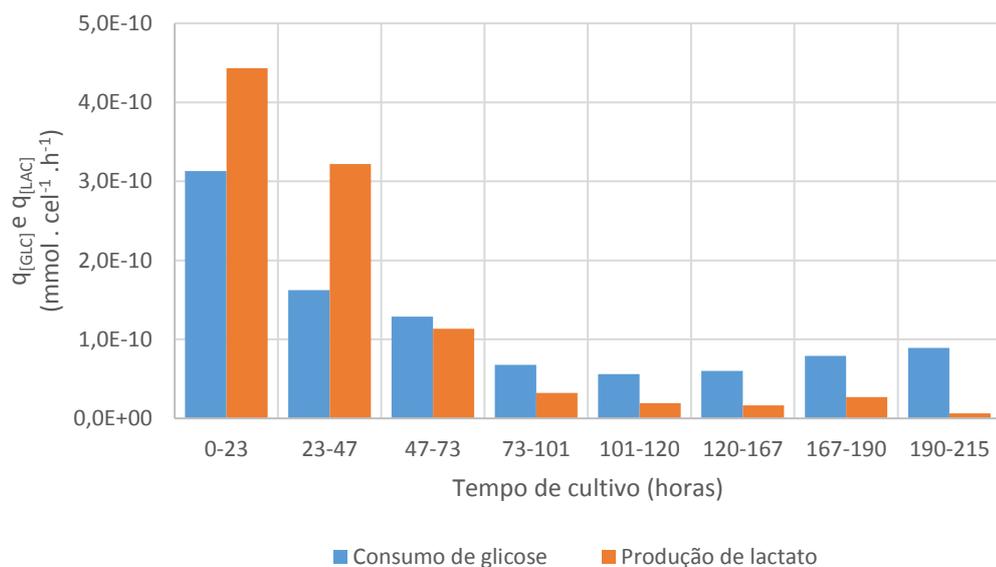


Figura 4.4. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante a cinética em batelada no biorreator RALF Plus.

Foi observada queda no consumo específico de glicose ($q_{[GLC]}$) nos primeiros cinco dias de cultivo, quando a disponibilidade de glicose no meio de cultivo também diminuiu gradativamente e a concentração de células viáveis aumentou. A taxa de produção específica de lactato ($q_{[LAC]}$) caiu drasticamente a partir do terceiro dia de cultivo, sugerindo alteração para um perfil metabólico mais eficiente, com um percentual maior de moléculas de glicose totalmente oxidadas e menor formação de

subprodutos, quando a concentração de glicose disponível foi reduzida (Figura 4.4). Alguns trabalhos avaliaram a influência da disponibilidade de glicose sobre o consumo de glicose e a produção de lactato. Foi observado que quanto menor a disponibilidade de glicose no meio de cultivo, menor a taxa de consumo de glicose pelas células e menor a taxa de conversão de glicose em lactato. (Cruz et al, 1999; Chee Fung Wong et al, 2004; Maranga e Goochee, 2006; Liu et al, 2014).

Em relação à produção da proteína de interesse (EPOhr), foi observado acúmulo constante na concentração no sobrenadante celular durante toda a cinética, chegando a $65,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Quando se iniciou a fase de declínio do cultivo celular, o aumento na concentração de EPOhr possivelmente está associado à lise celular e liberação de produto no sobrenadante.

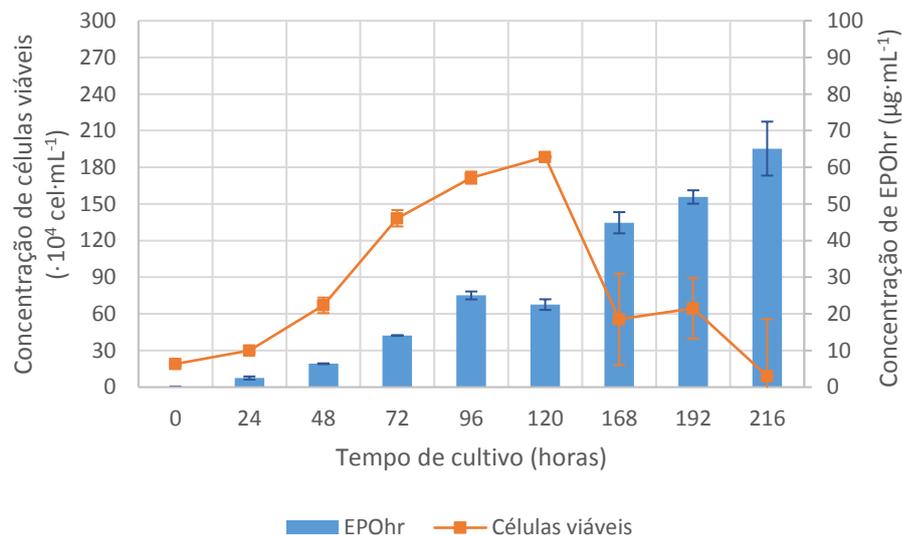


Figura 4.5. Concentração de EPOhr durante a cinética em batelada no biorreator RALF Plus.

A produtividade específica de EPOhr ($q_{[\text{EPOhr}]}$) leva em consideração a massa de proteína produzida em determinado intervalo de tempo e a concentração de células nesse mesmo intervalo. Até 101 horas de cultivo, foi observada redução gradativa na produtividade específica de EPOhr, variando de $0,46$ a $0,25 \text{ pg}\cdot\text{cel}\cdot\text{h}^{-1}$. No intervalo entre 101 e 120 h de cultivo, como não houve aumento na concentração de EPOhr, a produtividade foi nula. A partir de 120 horas de cultivo, houve um incremento na produtividade específica, observado também na de concentração de EPOhr no sobrenadante, apesar da queda na concentração celular. É possível que esse aumento seja devido à lise celular e liberação de produto ainda incompleto no

sobrenadante, no entanto pode estar associado também à mudança para um perfil metabólico mais eficiente, que favoreça a produção da proteína de interesse, como observado por Templeton e colaboradores em 2013 durante cultivo em batelada alimentada de células CHO produtoras de um anticorpo monoclonal. O pico de produção do anticorpo ocorreu nas fases que apresentaram maior oxidação de glicose, como as fases estacionária e de declínio, enquanto a fase com maior pico de crescimento celular apresentou consumo de glicose e produção de lactato em níveis mais altos.

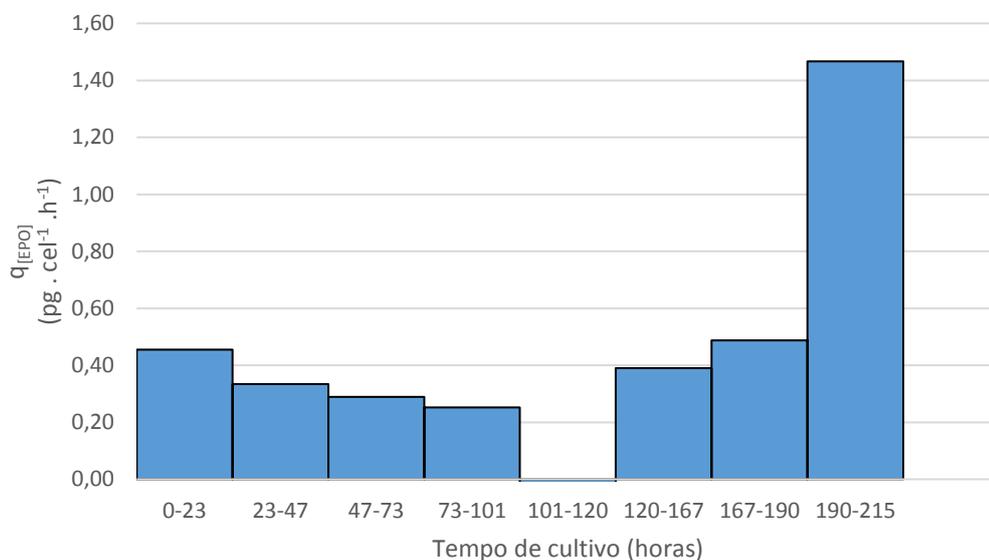


Figura 4.6. Produtividade específica de EPOhr durante a cinética em batelada no biorreator RALF Plus.

O momento ideal para o acionamento da bomba foi definido considerando-se o período em que o cultivo apresenta maior densidade celular e viabilidade igual ou superior a 80%. Desta forma, optou-se por realizar o teste do circuito de recirculação no terceiro dia de cultivo, pois a partir do quarto dia de cultivo, a viabilidade celular começa a decair. Foi estabelecida uma estratégia de retirada de meio exaurido com células do biorreator e adição de meio de cultivo fresco, para que a viabilidade não fosse afetada. Utilizando essa estratégia, seria possível atribuir possíveis quedas na viabilidade celular ao efeito da passagem das células pela bomba, e não à baixa concentração de nutrientes disponíveis e/ou acúmulo de metabólitos tóxicos no meio de cultivo. A taxa de diluição do biorreator foi calculada para que a concentração de células viáveis ficasse em torno de $1,0 \cdot 10^6$ cel·mL⁻¹.

4.2.1. Operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm

As células foram cultivadas no biorreator por 70 horas até o momento do teste com a bomba PuraLev® 200MU. A cavidade da bomba e as mangueiras acessórias já estavam preenchidas com meio de cultivo quando a bomba foi acionada, com velocidade de 1000 rpm. A bomba permaneceu em operação e recirculando a suspensão celular por 55 minutos a uma vazão de $0,69 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, promovendo 20 interações do cultivo com a câmara de bombeamento. Após o desligamento da bomba, as mangueiras de comunicação com o biorreator foram grampeadas, isolando a suspensão celular que permaneceu na cavidade da bomba. Este procedimento foi necessário para evitar que células aprisionadas no volume morto da tubulação e cavidade da bomba interferissem nos resultados, uma vez que este ambiente externo ao biorreator não estaria sujeito aos controles ambientais necessários, levando à morte celular. O cultivo foi monitorado por mais 72 horas, para avaliação dos efeitos da recirculação. Os dados da cinética de crescimento estão dispostos nas Tabelas 4.4 e 4.5 e nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9.

Na amostragem realizada logo após o inóculo do biorreator, a concentração de células viáveis foi de $2,8 \cdot 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, com viabilidade de 99% (Figura 4.7 e Tabela 4.4). Durante as primeiras 24 horas, o tempo de duplicação foi de 34 h e a taxa específica de crescimento $0,020 \text{ h}^{-1}$, compatível com a fase de adaptação observada no cultivo em batelada (Tabela 4.3).

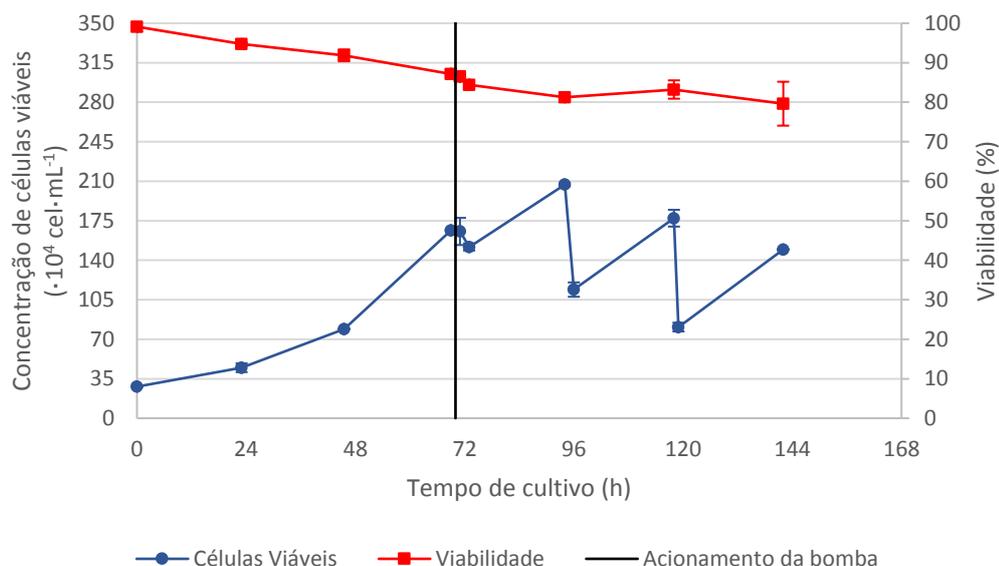


Figura 4.7. Curva de crescimento e viabilidade celular do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.

Entre 24 h e 69 h, o cultivo apresentou crescimento exponencial, chegando a $16,7 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, com viabilidade acima de 80%. Após 70 h de cultivo, a bomba PuraLev® 200MU foi acionada por 55 minutos (1000 rpm) a uma vazão de $0,69 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Após o desligamento da bomba, foi realizada nova amostragem e não foram observadas alterações significativas no número de células viáveis, células mortas e na viabilidade celular, que permaneceu acima de 80%. O mesmo resultado foi obtido em amostragem realizada 2 horas após o desligamento da bomba.

Tabela 4.4. Dados do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000rpm.

Tempo de cultivo (h)	Células Viáveis ($\cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Células Mortas ($\cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Células Totais ($\cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Viabilidade (%)	Glicose YSI ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Lactato YSI ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Diluição
0	28,0±0,7	0,3±0,4	28,3±1,1	99,1	3,02	0,21	
23	44,8±3,9	2,5±0,0	47,3±3,9	94,7	2,71	0,52	
46	79,0±0,0	7,0±1,4	86,0±1,4	91,9	2,25	0,92	
69	166,5±0,7	24,5±0,7	191,0±1,4	87,2	1,68	1,34	
71	165,5±12,0	26,0±2,1	191,5±14,1	86,4	1,63	1,35	
73	151,8±3,2	28,0±2,8	179,8±6,0	84,4	1,53	1,36	
94	207,0±1,4	47,8±1,8	254,8±0,4	81,3	1,21	1,54	1:1,8
96	114,0±6,4	24,5±8,5	138,5±2,1	82,3	2,14	0,82	
118	177,3±7,4	35,8±7,4	213,0±14,8	83,2	1,63	1,39	1:1,8
119	80,8±3,9	18,3±1,1	99,0±4,9	81,6	2,35	0,79	
142	149,5±0,0	38,3±13,1	187,8±13,1	79,6	1,71	1,28	

Na amostragem realizada 24 horas após o acionamento da bomba, a viabilidade celular foi de 81,3% e o tempo de duplicação aumentou para 79,6 h, ambos compatíveis com a fase do cultivo, de acordo com o experimento em batelada. A concentração de células viáveis chegou a $20,7 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e foi realizada diluição do biorreator (1:1,8), conforme estratégia adotada, reduzindo a concentração de células viáveis para $11,4 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Passadas 48 horas do acionamento da bomba e 24 horas da diluição do biorreator, a viabilidade permaneceu acima de 80%, a concentração de células viáveis atingiu $17,7 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e o tempo de duplicação caiu para 34,6 h. Os resultados indicam que as células não perderam a capacidade proliferativa, e a viabilidade celular

não foi afetada com a passagem do cultivo pela bomba. Nova diluição foi realizada (1:1,8), e a concentração de células viáveis passou para $8,1 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Na última amostragem, realizada 72 h após o acionamento da bomba, o tempo de duplicação passou a 25,9 h e a concentração de células viáveis atingiu $15,0 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, confirmando o retorno ao estado proliferativo.

Tabela 4.5. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante o experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000rpm.

Intervalo de tempo (h)	μ (h^{-1})	Td (h)	$q_{[GLC]}$ ($\cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$q_{[LAC]}$ ($\cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Y_{[LAC]/[GLC]}$ ($\text{mmol} \cdot \text{mmol}^{-1}$)
0-23	0,020	34,0	2,0	4,1	2,05
23-46	0,025	27,4	1,8	3,2	1,73
46-69	0,032	21,8	1,1	1,6	1,48
69-94	0,009	79,6	0,6	0,5	0,85
96-118	0,020	34,6	0,9	0,2	2,25
119-142	0,027	25,9	1,4	2,0	1,50

Tanto a concentração no sobrenadante (Figura 4.8), quanto os perfis das taxas de consumo e produção de glicose e lactato, respectivamente, (Figura 4.9) foram compatíveis com o observado na cinética em batelada. Pequenas variações podem ser observadas devido à variabilidade inerente aos sistemas biológicos.

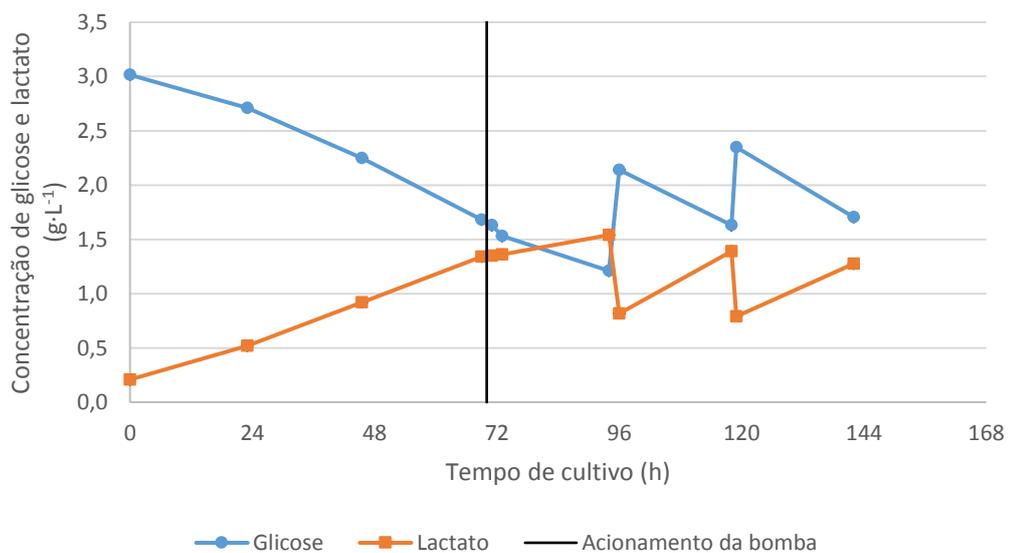


Figura 4.8. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.

Foi observada redução gradativa das taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato ao longo dos quatro primeiros dias de cultivo. Com a estratégia de diluição do biorreator adotada, o perfil de consumo e produção voltou a ficar similar ao observado no intervalo entre 46 -69 h.

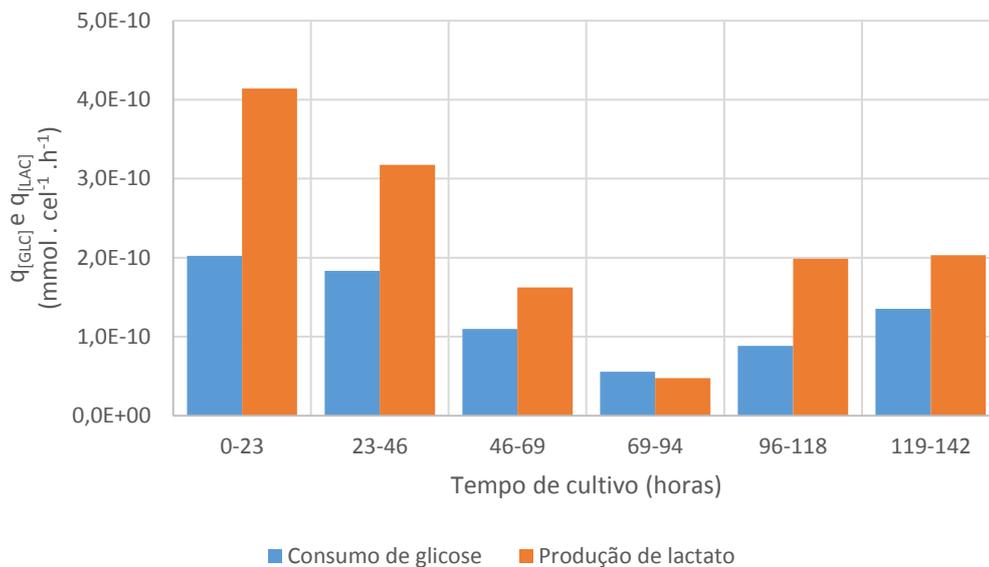


Figura 4.9. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 1000 rpm

O teste de exposição ao bombeamento com velocidade de 1000 rpm não afetou a viabilidade das células mantidas no biorreator. As variações observadas na taxa específica de crescimento, no perfil de consumo de glicose e no perfil de produção lactato foram compatíveis com as alterações observadas na cinética em batelada, e revertidas após o início da estratégia de alimentação do biorreator.

4.2.2. Operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm

As células foram cultivadas no biorreator por 72 horas até o momento do teste com a bomba PuraLev® 200MU. A cavidade da bomba e as mangueiras acessórias já estavam preenchidas com meio de cultivo quando a bomba foi acionada a 2000 rpm. A bomba permaneceu em operação e recirculando a suspensão celular por 18 minutos, a uma vazão de $1,92 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, promovendo 20 interações do cultivo com a câmara de bombeamento. Após o desligamento da bomba, as mangueiras de comunicação com o biorreator foram grampeadas, isolando a suspensão celular que

permaneceu na cavidade da bomba, conforme já informado. O cultivo foi monitorado por 72 horas, para avaliação dos efeitos da recirculação. Os dados da cinética de crescimento estão dispostos nas Tabelas 4.6 e 4.7 e nas Figuras 4.10, 4.11 e 4.12.

Após o inóculo do biorreator, a concentração de células viáveis foi de $2,2 \cdot 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, com viabilidade de 92%. Não foi possível realizar amostragens 24 e 48 horas após o inóculo. No entanto, algumas taxas foram calculadas utilizando o intervalo de tempo entre 0 e 68 horas. Os valores obtidos não são representativos, pois englobam diferentes fases do cultivo, como a fase de adaptação e a fase exponencial, mas dão uma ideia geral do comportamento das células durante esse período. O tempo de duplicação nesse intervalo de tempo foi de $27,7 \text{ h}^{-1}$. Na amostragem realizada com 68 horas de cultivo, a viabilidade celular foi de 93% e a concentração de células viáveis chegou a $12,2 \cdot 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 4.10).

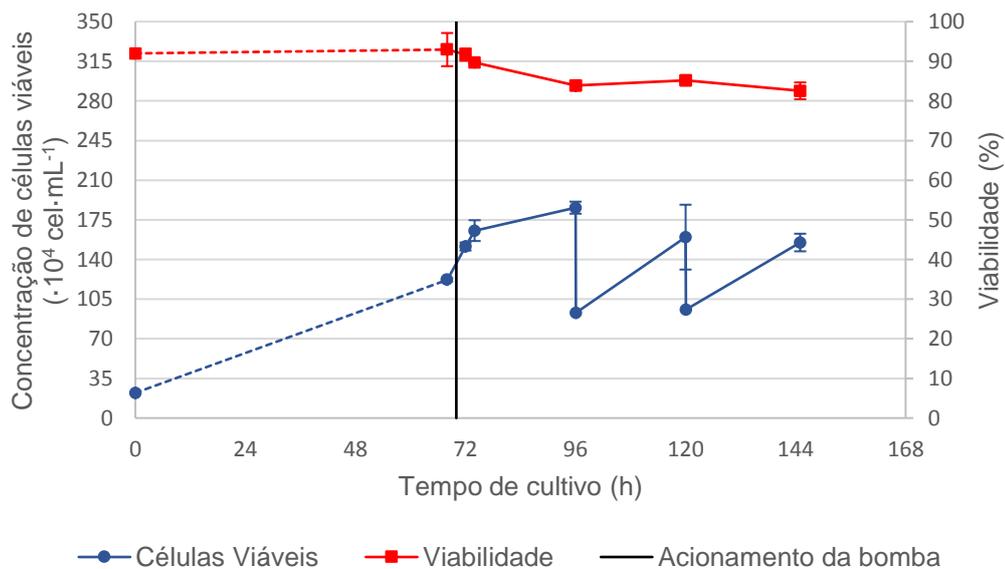


Figura 4.10. Curva de crescimento e viabilidade celular do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.

Após 72 h de cultivo, a bomba PuraLev® 200MU foi acionada por 18 minutos (2000 rpm) a uma vazão de $1,92 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Após o desligamento da bomba, foi realizada nova amostragem e foi observado um pequeno aumento na concentração de células viáveis. Este efeito pode estar relacionado à dissociação de agregados celulares por efeito da passagem pela bomba, resultando em um aumento na dispersão celular no meio de cultivo. Não foi observada alteração significativa na viabilidade celular. Para

avaliação à curto prazo do impacto da recirculação, foi realizada nova amostragem duas horas após o procedimento. Novamente, os resultados mostraram que não houve impacto no crescimento e na viabilidade celular.

Tabela 4.6. Dados do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000rpm.

Tempo de cultivo (h)	Células Viáveis ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Células Mortas ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Células Totais ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Viabilidade (%)	Glicose YSI (g·L ⁻¹)	Lactato YSI (g·L ⁻¹)	Diluição
0	22,3	1,9	24,2	92,0	3,16	0,31	--
68	122,0±1,4	9,3±6,0	131,3±7,4	93,0	2,00	1,22	--
72	151,5±3,5	13,8±2,5	165,3±1,1	91,7	1,92	1,22	--
74	165,5±9,2	19,0±1,4	184,5±10,6	89,7	1,84	1,25	--
96	185,8±5,3	35,8±3,9	221,5±9,2	83,9	1,49	1,56	1:2
96*	92,9*	17,9*	110,8*	83,9*	2,66*	0,78*	--
120	159,8±28,6	27,8±3,9	187,5±32,5	85,2	1,86	1,28	1:1,7
120*	95,9*	16,7*	112,5*	85,2*	2,64*	0,77*	--
145	155,0±7,8	32,8±3,2	187,8±4,6	82,6	1,75	1,33	--

*valores calculados por balanço de massa.

Na amostragem realizada 24 horas após o acionamento da bomba, a viabilidade celular foi de 83,9% e o tempo de duplicação aumentou para 46,2 h, ambos compatíveis com a fase do cultivo, de acordo com o experimento em batelada. A concentração de células viáveis chegou a $18,6 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ e foi realizada diluição do biorreator (1:2), reduzindo a concentração de células viáveis para $9,3 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹.

Passadas 48 horas do acionamento da bomba e 24 horas da diluição do biorreator, a viabilidade permaneceu acima de 80%, a concentração de células viáveis atingiu $16,0 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ e o tempo de duplicação caiu para 30,5 h. Isso sugere que as células não perderam a capacidade proliferativa e a viabilidade celular não foi afetada com a passagem do cultivo pela bomba. Nova diluição foi realizada (1:1,7), e a concentração de células viáveis passou para $9,6 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹.

Na última amostragem, realizada 72 h após o acionamento da bomba, o tempo de duplicação passou a 35,9 h e a concentração de células viáveis atingiu $15,5 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹.

Tabela 4.7. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante o experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000rpm.

Tempo de Cultivo (h)	μ (h^{-1})	Td (h)	$q_{[GLC]}$ ($\cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$q_{[LAC]}$ ($\cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Y_{[LAC]/[GLC]}$ ($\text{mmol} \cdot \text{mmol}^{-1}$)
0-68	0,025	27,7	1,3	2,1	1,58
68-96	0,015	46,2	0,7	0,9	1,33
96-120	0,023	30,5	1,5	1,8	1,25
120-145	0,019	35,9	1,6	2,0	1,26

Tanto a concentração no sobrenadante, quanto o perfil de consumo e produção de glicose e lactato foram compatíveis com o observado na cinética controle em batelada. No momento em que a bomba foi acionada, a concentração de glicose estava na faixa de 1,5 – 2,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ e a concentração de lactato na faixa de 1,0 – 1,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 4.11).

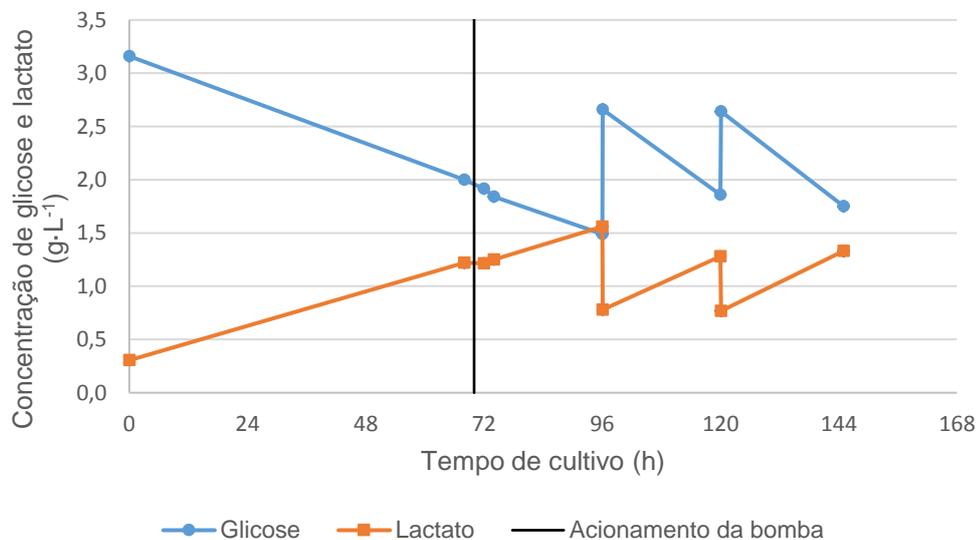


Figura 4.11. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.

No intervalo entre 68 e 96 h as taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato foram reduzidas. No entanto, após as trocas de meio de cultivo, quando a disponibilidade de glicose aumentou, essas taxas aumentaram novamente (Figura 4.12).

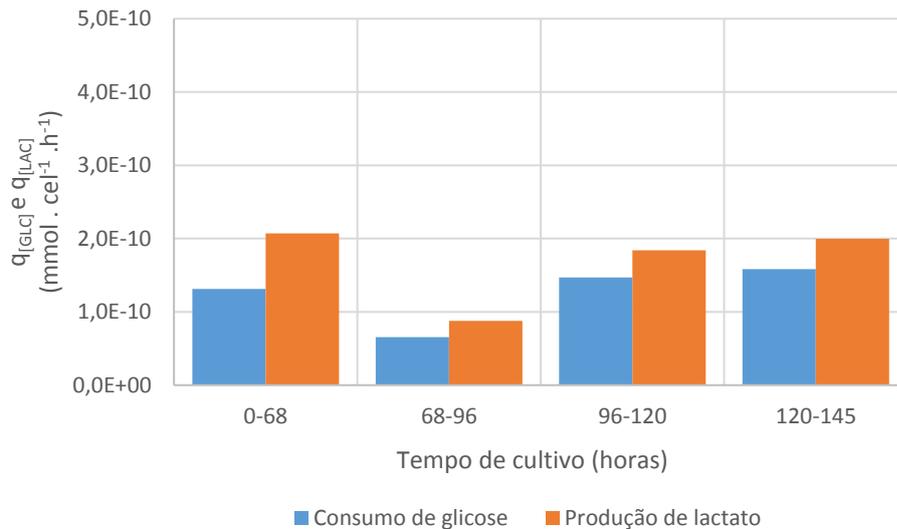


Figura 4.12. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 2000 rpm.

O teste de exposição ao bombeamento com velocidade de 2000 rpm também não afetou a viabilidade das células mantidas no biorreator. As variações observadas na taxa específica de crescimento, no perfil de consumo de glicose e no perfil de produção lactato também foram compatíveis com as variações observadas na cinética em batelada, e revertidas após o início da estratégia de alimentação do biorreator.

4.2.3. Operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm

As células foram cultivadas no biorreator por 72 horas até o momento do teste com a bomba PuraLev® 200MU. A cavidade da bomba e as mangueiras acessórias já estavam preenchidas com meio de cultivo quando a bomba foi acionada a 3000 rpm. A bomba permaneceu em operação e recirculando a suspensão celular por 13 minutos. Após o desligamento, as mangueiras de comunicação com o biorreator foram grampeadas, isolando a suspensão celular que permaneceu na cavidade da bomba. O cultivo foi monitorado por 72 horas, para avaliação dos efeitos da recirculação. Os dados da cinética de crescimento estão dispostos nas tabelas 4.8 e 4.9 e nas Figuras 4.13, 4.14 e 4.15.

Após o inóculo do biorreator, a concentração de células viáveis foi de $3,1 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, com viabilidade de 97,6% (Figura 4.13). Durante as primeiras 24 horas, o tempo de duplicação foi de 54 h e a taxa específica de crescimento $0,013 \text{ h}^{-1}$, compatível com a fase de adaptação observada no cultivo em batelada.

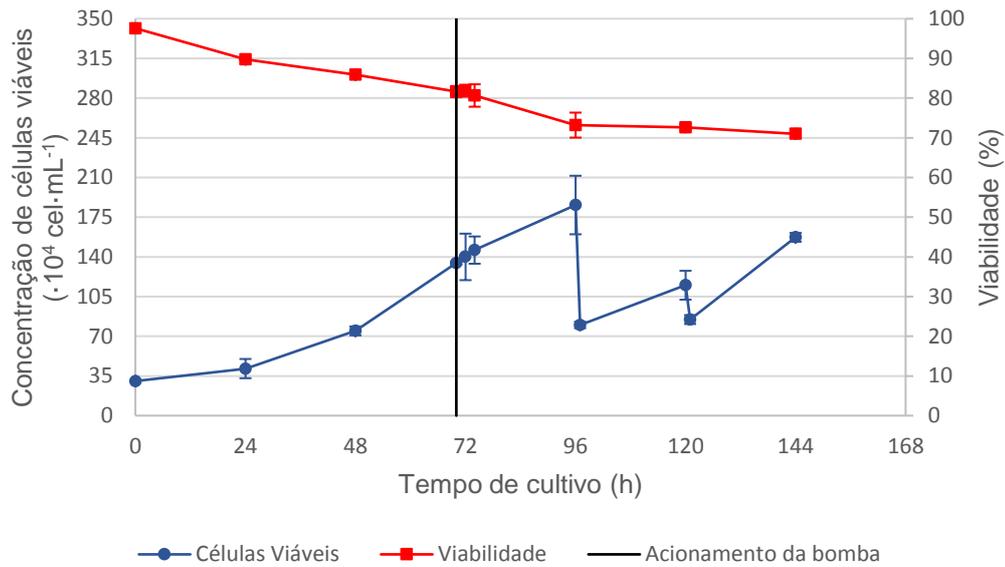


Figura 4.13. Curva de crescimento e viabilidade celular do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.

Entre 24 e 70 h, o cultivo apresentou crescimento exponencial, chegando a $13,5 \cdot 10^5$ cel·mL $^{-1}$, com viabilidade acima de 80%. Após 72 h de cultivo, a bomba PuraLev® 200MU foi acionada por 13 minutos (3000 rpm) a uma vazão de $3,17$ L·min $^{-1}$, promovendo 20 interações do cultivo com a câmara de bombeamento.

Tabela 4.8. Dados do experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000rpm.

Tempo de cultivo (h)	Células Viáveis ($\cdot 10^4$ cel·mL $^{-1}$)	Células Mortas ($\cdot 10^4$ cel·mL $^{-1}$)	Células Totais ($\cdot 10^4$ cel·mL $^{-1}$)	Viabilidade (%)	Glicose YSI (g·L $^{-1}$)	Lactato YSI (g·L $^{-1}$)	Diluição
0	30,5±1,4	0,8±0,4	31,3±1,8	97,6	3,11	0,14	
24	41,5±8,5	4,8±1,1	46,3±9,5	89,7	2,71	0,29	
48	74,8±3,9	12,3±1,1	87,0±4,9	85,9	2,56	0,75	
70	134,5±1,4	30,3±3,2	164,8±4,6	81,6	1,83	1,19	
72	140,0±20,5	31,0±1,4	171,0±21,9	81,9	1,90	1,24	
74	146,0±12,0	35,0±9,2	181,0±21,2	80,7	1,85	1,26	
96	185,8±25,8	68,0±1,4	253,8±24,4	73,2	1,34	1,53	1:2
97	80,0±2,8	32,3±0,4	112,3±2,5	71,3	2,41	0,70	
120	115,0±12,7	43,3±3,2	158,3±15,9	72,7	1,98	1,18	1:1,2
121	84,8±3,9	37,0±1,4	121,8±5,3	69,6	2,08	1,02	
144	157,3±3,9	64,3±1,1	221,5±2,8	71,0	1,51	1,52	

Após o desligamento da bomba, foi realizada nova amostragem e não foram observadas alterações significativas no número de células viáveis, células mortas e na viabilidade celular, que permaneceu acima de 80%. O mesmo resultado foi obtido na amostragem realizada 2 horas após o desligamento da bomba.

Na amostragem realizada 24 horas após o acionamento da bomba, a viabilidade celular caiu para 73,2% e o tempo de duplicação aumentou para 55,8 h. A concentração de células viáveis chegou a $18,6 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e foi realizada diluição do biorreator (1:2), reduzindo a concentração de células viáveis para $8,0 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Passadas 48 horas do acionamento da bomba e 24 horas da diluição do biorreator, a viabilidade permaneceu em 72,7%, a concentração de células viáveis chegou apenas a $11,5 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e o tempo de duplicação foi de 43,9 h. Nova diluição foi realizada, desta vez apenas 1:1,2, pois a concentração celular já estava muito próxima de $10 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. A concentração final de células viáveis após a diluição foi de $8,5 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Na última amostragem, realizada 72 h após o acionamento da bomba, o tempo de duplicação foi reduzido a 25,8 h e a concentração de células viáveis atingiu $15,7 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, mostrando a retomada da capacidade proliferativa do cultivo. No entanto, a viabilidade celular permaneceu próxima a 70%.

Tabela 4.9 Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante o experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000rpm.

Tempo de Cultivo (h)	μ (h^{-1})	Td (h)	$q_{[GLC]}$ ($\cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$q_{[LAC]}$ ($\cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Y_{[LAC]/[GLC]}$ ($\text{mmol} \cdot \text{mmol}^{-1}$)
0-24	0,013	54,0	1,9	1,9	0,97
24-48	0,025	28,3	1,4	3,7	2,66
48-70	0,027	26,0	1,3	2,1	1,65
70-96	0,012	55,8	0,7	0,9	1,39
97-120	0,016	43,9	1,1	2,4	2,25
121-144	0,027	25,8	1,2	2,0	1,72

Tanto a concentração no sobrenadante (Figura 4.14), quanto os perfis das taxas de consumo e produção de glicose e lactato, respectivamente, (Figura 4.15) foram compatíveis com o observado na cinética em batelada. Na amostragem

realizada 96 h após o inóculo, a concentração de glicose foi de $1,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No mesmo período da cinética em batelada, a concentração de glicose estava na mesma faixa e a viabilidade do cultivo era de 75,4%.

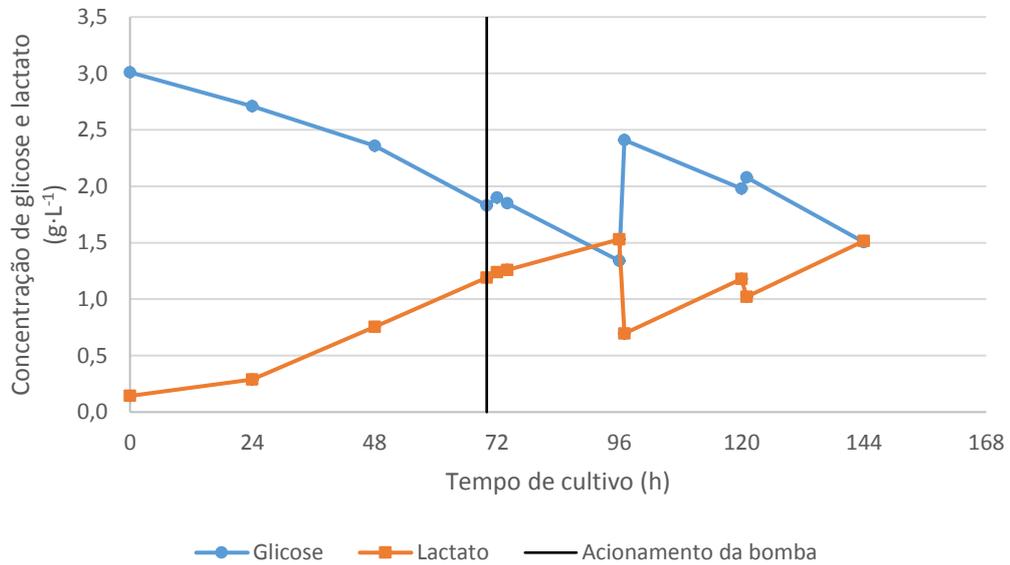


Figura 4.14. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm. A linha vertical mostra o momento em que a bomba foi acionada.

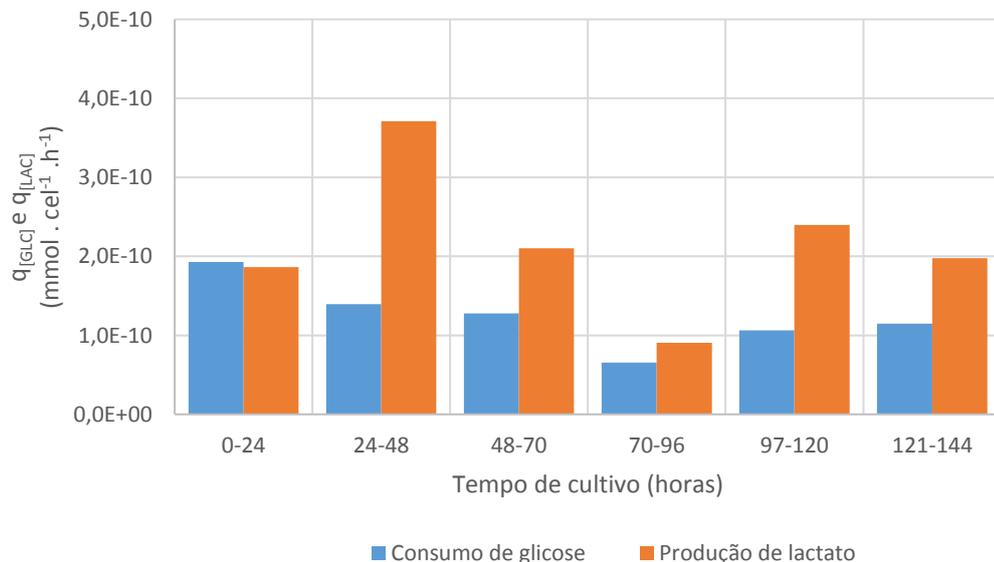


Figura 4.15. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante experimento com operação da bomba PuraLev® 200MU a 3000 rpm.

A redução da viabilidade do cultivo após o acionamento da bomba a 3000 rpm, assim como a menor taxa específica de crescimento ($0,016 \text{ h}^{-1}$), observada no

intervalo de 97 a 120 h, podem ter sido consequência do estresse mecânico causado pela recirculação da suspensão celular. Porém não está descartada a possibilidade de que a causa tenha sido apenas a privação de nutrientes ou acúmulo de metabólitos. Por este motivo, foi necessário rever o desenho dos experimentos seguintes, adiantando um dia o acionamento da bomba PuraLev® 200MU para que a primeira troca de meio de cultivo fosse realizada após 72 horas do inóculo. Desta forma, a operação em modo semi-contínuo começaria antes que os níveis do nutriente monitorado alcançasse níveis muito baixos, evitando que o cultivo entrasse em estresse. O acionamento antecipado da bomba em relação ao início da troca de meio impediria que os efeitos do acionamento da bomba, da privação de nutrientes e acúmulo de componentes tóxicos se misturassem, dificultando a análise dos resultados.

4.3. Avaliação do impacto da operação contínua do circuito de recirculação

Após os testes iniciais com a bomba PuraLev® 200MU, em que três diferentes velocidades foram testadas por tempo suficiente para promover a recirculação de 20 vezes o volume de operação do biorreator, experimentos foram realizados para avaliar o impacto da operação contínua do circuito de recirculação.

Uma corrida controle foi realizada no biorreator, sem o acionamento da bomba PuraLev® 200MU e com a nova estratégia de alimentação, que prevê o início das trocas de meio de cultivo 72 horas após o inóculo do biorreator. A corrida controle, em modo de operação semi-contínuo, durou 7 dias e foi monitorada diariamente. Os dados da cinética de crescimento estão dispostos nas Tabelas 4.10 e 4.11 e nas Figuras 4.16, 4.17 e 4.18.

As primeiras 70 horas do cultivo mostram um período de crescimento exponencial com tempos de duplicação entre 20,4 e 26,9 h, taxas específicas de crescimento entre 0,026 e 0,034 h⁻¹, viabilidade acima de 85% e com a concentração de células viáveis chegando a 14,3·10⁵ cel·mL⁻¹. Muito similar ao mesmo período da cinética em batelada, como é possível observar na Figura 4.16.

Entre 72 e 94 horas, período após a primeira diluição do biorreator (1:1,4), a taxa específica de crescimento caiu para faixa de 0,020 h⁻¹ e o tempo de duplicação subiu para 35,0 h. Essa alteração pode estar relacionada com a taxa de diluição do biorreator, que visando retornar à concentração de células viáveis de 10·10⁵ cel·mL⁻¹

promoveu a troca de um volume pequeno de meio de cultivo. A viabilidade permaneceu acima de 80%, diferente do que acontece na cinética em batelada, que nesse mesmo período já apresenta queda na viabilidade celular.

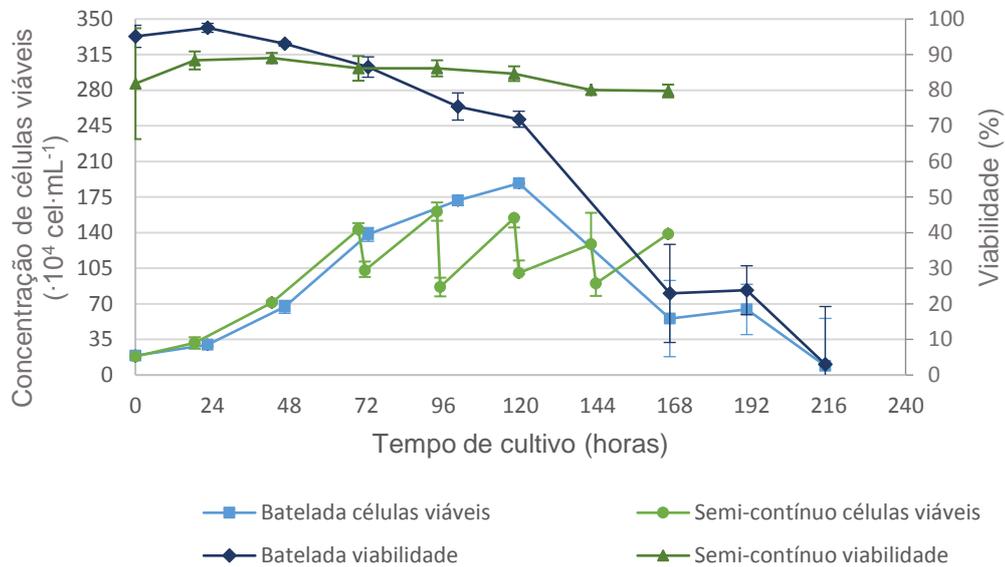


Figura 4.16. Comparação das curvas de crescimento e viabilidade celular das cinéticas controle em modo batelada e modo semi-contínuo.

Tabela 4.10. Dados da cinética controle em modo semi-contínuo.

Tempo de cultivo (h)	Células Viáveis ($\cdot 10^4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Células Mortas ($\cdot 10^4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Células Totais ($\cdot 10^4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Viabilidade (%)	Glicose YSI ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Lactato YSI ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Diluição
0	18,3±1,8	4,3±2,4	22,5±2,1	81,8	3,01	0,27	--
19	31,5±5,7	4,3±1,8	35,8±7,4	88,4	2,90	0,44	--
43	71,3±1,8	8,8±1,1	80,0±0,7	86,4	2,40	0,87	--
70	143,0±6,4	23,0±5,7	166,0±0,7	89,1	1,79	1,35	1:1,4
72	102,8±8,8	10,0±1,4	112,8±7,4	86,1	2,26	1,00	--
94	160,5±9,2	26,0±6,4	186,5±15,6	91,1	1,58	1,51	1:1,7
95	86,5±9,2	13,5±3,5	100,0±5,7	86,2	2,24	0,89	--
118	154,3±1,1	28,0±4,2	182,3±3,2	86,4	1,59	1,46	1:1,5
120*	100,3*	18,2*	118,5*	84,7	2,36	0,95	--
142	128,8±12,4	32,0±2,8	160,8±15,2	84,7	1,48	1,56	1:1,4
144*	90,1*	22,4*	112,5*	80,1	2,18	1,09	--
166	138,8±30,8	34,8±3,9	173,5±34,6	80,1	1,38	1,61	1:1,7

*valores calculados por balanço de massa.

Ao longo do cultivo foram realizadas mais quatro trocas de meio de cultivo, com diluições variando entre 1:1,4 e 1:1,7. A viabilidade permaneceu acima de 80% e os tempos de duplicação variaram entre 27,6 e 62,4 h.

Tabela 4.11. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética controle em modo semi-contínuo.

Intervalo de tempo (h)	μ (h ⁻¹)	Td (h)	$q_{[GLC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol-cel ⁻¹ ·h ⁻¹)	$q_{[LAC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol-cel ⁻¹ ·h ⁻¹)	$Y_{[LAC]/[GLC]}$ (mmol·mmol ⁻¹)
0-19	0,030	23,5	3,3	4,9	1,50
19-43	0,034	20,4	1,5	3,6	2,38
43-70	0,026	26,9	1,2	1,8	1,56
72-94	0,020	35,0	1,3	1,9	1,51
95-118	0,025	27,6	1,3	2,3	1,77
120-142	0,011	62,4	1,9	2,6	1,38
144-166	0,019	36,1	1,7	2,2	1,30

Não foi observada queda nas taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato no período de 72 a 94 horas (pós diluição), como era observado antes com a utilização da outra estratégia de alimentação do biorreator, nos experimentos de operação da bomba a 1000, 2000 e 3000 rpm. O perfil foi similar nos dias subsequentes (Figuras 4.17 e 4.18).

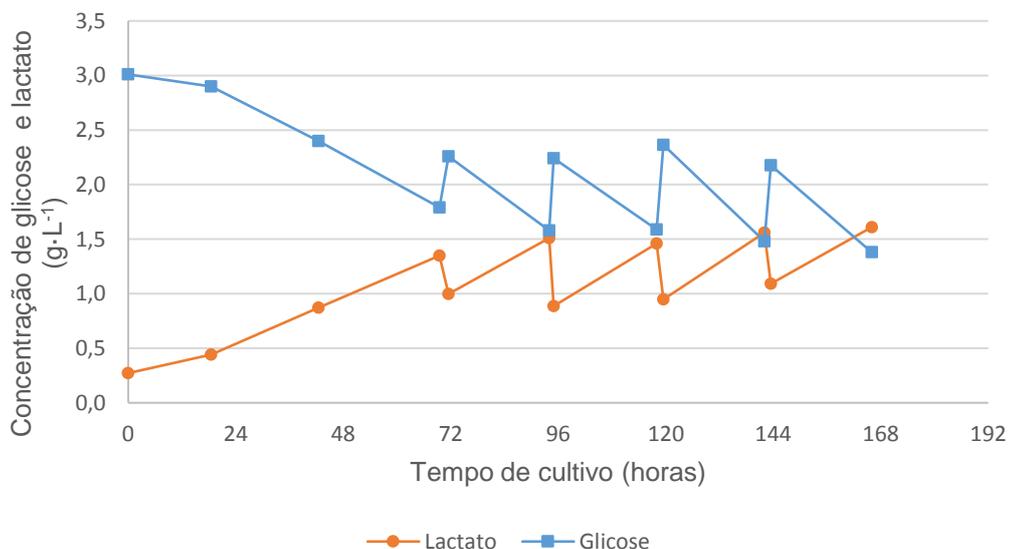


Figura 4.17. Curva de concentração de glicose e lactato no sobrenadante do cultivo da cinética controle em modo semi-contínuo.

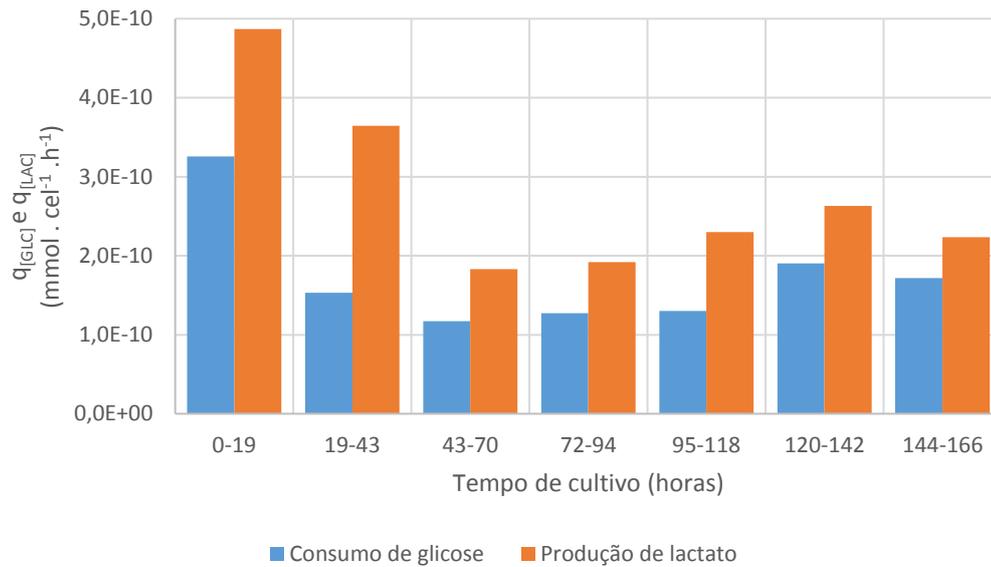


Figura 4.18. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante a cinética controle em modo semi-contínuo.

Como estratégia de alimentação para os próximos experimentos, ficou definido que as trocas de meio de cultivo teriam início 72 horas após o inóculo do biorreator. Optou-se pela utilização da concentração de glicose como parâmetro para diluição do biorreator e não mais a concentração de células viáveis. A verificação da concentração de glicose é mais precisa que a de células viáveis, devido à formação de agregados celulares e ao erro embutido na metodologia de quantificação celular.

4.3.1. Teste de recirculação contínua I

O primeiro experimento para avaliação da operação contínua do circuito de recirculação durou 15 dias, dos quais 13 dias contaram com a operação ininterrupta da bomba PuraLev® 200MU. Os dados referentes à cinética de crescimento durante o primeiro teste de recirculação contínua estão dispostos nas Tabelas 4.12 e 4.13.

A bomba foi acionada com a velocidade de 1000 rpm, 42 h após o inóculo de $2,0 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ no biorreator. No momento do acionamento da bomba, a concentração de células viáveis era de $7,8 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e a viabilidade celular era de 90% (Figura 4.19).

A expectativa inicial era que, após 24 horas de acionamento contínuo da bomba, o cultivo apresentasse queda significativa da viabilidade celular, pois admitindo a vazão de $0,69 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, em 24 horas seriam quase 500 interações do cultivo com a câmara de bombeamento, número muito superior às 20 interações

adotadas nos experimentos anteriores. No entanto, a viabilidade celular na amostragem 24 h após o acionamento foi de 86%, e a concentração de células viáveis chegou a $13,7 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. O tempo de duplicação passou para 30 h e a taxa específica de crescimento para $0,023 \text{ h}^{-1}$, variação condizente com o período do cultivo, mostrando que a capacidade proliferativa não foi afetada, quando comparado ao mesmo período dos cultivos controles.

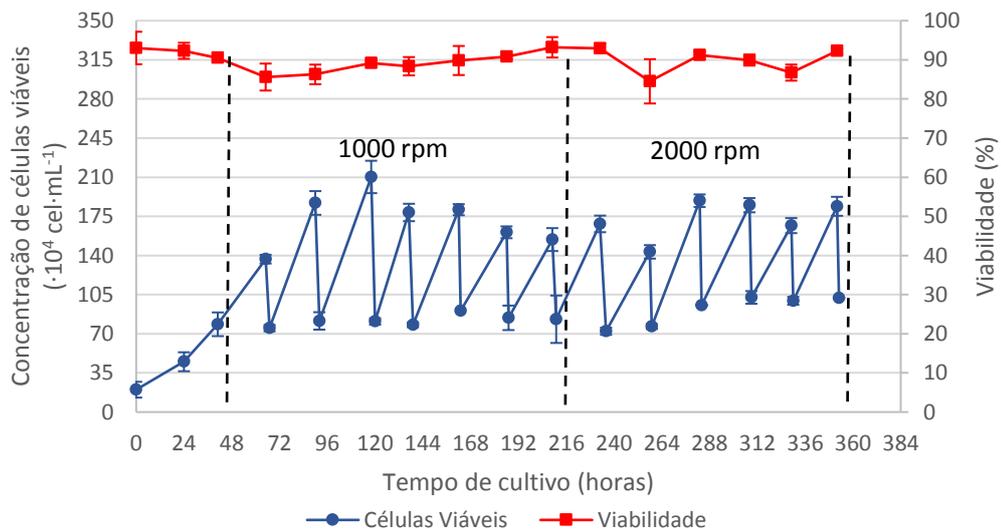


Figura 4.19. Curva de crescimento e viabilidade celular do primeiro teste de recirculação contínua.

A operação do modo semi-contínuo do biorreator foi iniciada 65 h após o inóculo. Após a primeira diluição, a concentração de células viáveis retornou para $7,5 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e com 48 h de acionamento contínuo a concentração de células viáveis atingiu $18,7 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, com tempo de duplicação de 17,4 horas. A taxa específica de crescimento de $0,040 \text{ h}^{-1}$ pode se justificar pelo microambiente favorável, com disponibilidade de nutrientes e baixa concentração de metabólitos tóxicos, aliado à possível desagregação dos grumos, característicos do crescimento em suspensão de células CHO. A modificação do ambiente hidrodinâmico no biorreator pode ter facilitado a transferência de oxigênio, contribuindo também para o aumento da proliferação. Células liberadas do interior dos grumos passam a ter acesso aos nutrientes e voltam a proliferar, além de tornar a suspensão mais homogênea, reduzindo os erros na amostragem e na quantificação. Pinto e colaboradores (2008) observaram a desagregação de grumos celulares, por análise de distribuição de tamanho de partículas e visualização do cultivo ao microscópio, após a passagem de células CHO por um dispositivo de retenção celular, e sugeriram

que liberação de células mortas do interior dos grumos pode ter afetado o cálculo de viabilidade do cultivo.

Tabela 4.12. Dados da cinética de crescimento do primeiro teste de recirculação contínua.

	Tempo de cultivo (h)	Células Viáveis ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Células Mortas ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Células Totais ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Viabilidade (%)	Glicose YSI (g·L ⁻¹)	Lactato YSI (g·L ⁻¹)	EPOhr (μ g·mL ⁻¹)	Diluição
	0	20,0 \pm 7,1	1,5 \pm 1,4	21,5 \pm 8,5	93,0	3,1	0,19	2,7 \pm 0,0	
	24	45,0 \pm 8,5	3,8 \pm 1,8	48,8 \pm 10,3	92,3	2,8	0,46	3,3 \pm 0,3	
	41	78,5 \pm 10,6	8,3 \pm 1,8	86,8 \pm 12,4	90,5	2,4	0,72	6,1 \pm 0,2	
	65	136,8 \pm 3,9	23,0 \pm 7,1	159,8 \pm 11,0	85,6	1,8	1,31	10,3 \pm 0,4	1:1,8
	67	75,0 \pm 2,8	14,5 \pm 0,7	89,5 \pm 2,1	83,8	2,5	0,80	5,6*	
	90	187,0 \pm 10,6	29,8 \pm 4,6	216,8 \pm 6,0	86,3	1,8	1,46	10,0 \pm 0,3	1:2
	92	81,5 \pm 7,8	15,0 \pm 1,4	96,5 \pm 9,2	84,5	2,6	0,80	5,0*	
	118	210,3 \pm 14,5	25,5 \pm 0,0	235,8 \pm 14,5	89,2	1,7	1,58	9,8 \pm 0,2	1:2
	120	81,0 \pm 2,8	12,0 \pm 1,4	93,0 \pm 4,2	87,1	2,5	0,82	4,9*	
1000 rpm	137	178,5 \pm 7,8	23,5 \pm 6,4	202,0 \pm 14,1	88,4	1,8	1,35	9,6 \pm 1,1	1:2
	139	78,0 \pm 2,1	9,3 \pm 2,5	87,3 \pm 4,6	89,4	2,6	0,72	4,8*	
	162	181,0 \pm 4,9	20,5 \pm 7,8	201,5 \pm 2,8	89,8	1,8	1,48	9,7 \pm 0,7	1:2
	163	90,5 *	10,3 *	100,8 *	89,8*	2,5*	0,74*	4,8*	
	186	160,8 \pm 5,3	16,3 \pm 1,8	177,0 \pm 7,1	90,8	1,8	1,50	7,7 \pm 0,4	1:2
	187	84,3 \pm 11,0	11,3 \pm 0,4	95,5 \pm 11,3	88,2	2,5	0,81	3,9*	
	209	154,3 \pm 10,3	11,3 \pm 3,9	165,5 \pm 6,4	93,2	1,8	1,52	6,3 \pm 0,1	1:2,4
	211	83,0 \pm 21,2	9,5 \pm 2,8	92,5 \pm 18,4	89,7	2,4	0,87	2,6*	
	233	168,3 \pm 7,4	12,8 \pm 1,8	181,0 \pm 5,7	93,0	1,7	1,51	7,4 \pm 0,8	1:2
	236	72,3 \pm 3,2	11,0 \pm 4,2	83,3 \pm 7,4	86,8	2,5	0,79	3,7*	
	258	143,3 \pm 6,0	26,3 \pm 10,3	169,5 \pm 4,2	84,5	1,9	1,43	6,5 \pm 0,4	1:1,8
	259	76,5 \pm 2,1	8,3 \pm 3,2	84,8 \pm 5,3	90,3	2,5	0,89	3,6*	
	283	189,0 \pm 5,7	18,3 \pm 1,8	207,3 \pm 3,9	91,2	1,6	1,62	6,8 \pm 1,1	1:2
2000 rpm	284	95,5 \pm 0,0	10,3 \pm 1,8	105,8 \pm 1,8	90,3	2,2	0,84	3,4*	
	308	185,0 \pm 6,4	20,8 \pm 2,5	205,8 \pm 3,9	89,9	1,6	1,63	5,1 \pm 0,3	1:2
	309	102,5 \pm 5,7	11,5 \pm 2,8	114,0 \pm 2,8	89,9	2,4	0,87	2,5*	
	329	166,8 \pm 6,7	25,5 \pm 3,5	192,3 \pm 3,2	86,7	1,7	1,50	-	1:2
	330	99,5 \pm 3,5	11,0 \pm 2,1	110,5 \pm 1,4	90,0	2,5	0,81	-	
	352	184,0 \pm 8,5	15,5 \pm 0,7	199,5 \pm 7,8	92,2	1,6	1,61	-	1:2
	353	102,0 \pm 0,0	7,5 \pm 2,8	109,5 \pm 2,8	93,2	2,5	0,85	-	

*valores calculados por balanço de massa.

Tabela 4.13. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética de crescimento do primeiro teste de recirculação contínua.

	Intervalo de tempo (h)	μ (h^{-1})	Td (h)	$q_{[GLC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol·cel $^{-1}$ ·h $^{-1}$)	$q_{[LAC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol·cel $^{-1}$ ·h $^{-1}$)	$Y_{[LAC]/[GLC]}$ (mmol·mmol $^{-1}$)	$q_{[EPOhr]}$ (pg·cel $^{-1}$ ·h $^{-1}$)
	0-24	0,034	20,5	2,1	3,8	1,79	0,07
	24-41	0,033	21,2	2,1	2,8	1,34	0,27
1000 rpm	41-65	0,023	30,0	1,2	2,5	2,15	0,16
	67-90	0,040	17,4	1,4	2,4	1,79	0,14
	92-118	0,036	19,0	1,3	2,3	1,75	0,13
	120-137	0,046	14,9	1,6	2,7	1,63	0,21
	139-162	0,037	18,9	1,6	2,8	1,77	0,16
	163-186	0,025	27,7	1,7	2,9	1,70	0,10
	187-209	0,027	25,2	1,6	3,0	1,88	0,09
	211-233	0,032	21,6	1,5	2,6	1,77	0,17
2000 rpm	236-258	0,031	22,3	1,6	3,0	1,89	0,12
	259-283	0,038	18,4	1,4	2,6	1,78	0,10
	284-308	0,028	25,2	1,1	2,6	2,48	0,05
	309-329	0,024	28,5	1,3	2,6	1,95	-
	330-352	0,038	24,8	1,5	2,8	1,94	-

A bomba permaneceu recirculando a suspensão por 168 horas (7 dias) com a velocidade de 1000 rpm. Nesse período, o tempo de duplicação celular médio foi de 21,7 h, variando de 14,9 a 30,0 h e a taxa específica de crescimento permaneceu entre 0,023 e 0,046 h^{-1} , condizentes com a fase exponencial do cultivo de células CHO em experimentos controle, sugerindo que a capacidade proliferativa do cultivo foi mantida apesar do possível estresse gerado pelas sucessivas passagens pela câmara de bombeamento. A viabilidade celular se manteve acima de 85% durante todo o período, não sendo observado aumento significativo na concentração de células mortas, quantificadas pela metodologia de azul de tripano.

A segunda fase do experimento foi iniciada após 216 h de cultivo, quando a velocidade da bomba foi ajustada para 2000 rpm. A vazão passou a ser de 1,92 L·min $^{-1}$, promovendo a recirculação de todo o volume do biorreator por mais de 1380 vezes a cada 24 horas. Aumentando, desta forma, tanto a intensidade do estímulo quanto o número de exposições do cultivo à câmara de bombeamento. A

bomba permaneceu ligada por mais 144 horas (6 dias), quando o experimento foi interrompido, desta forma, não foi possível realizar o teste de exposição contínua à velocidade de 3000 rpm.

Assim como na primeira fase do experimento, a viabilidade celular permaneceu acima de 85% com a operação da bomba a 2000 rpm. O tempo de duplicação médio no período foi de 23,5 h, variando entre 18,4 e 28,5 h, com taxas específicas de crescimento variando entre 0,024 e 0,038 h⁻¹.

Confirmando o que foi observado nos testes preliminares, as velocidades de 1000 e 2000 rpm do impelidor da bomba PuraLev® 200MU não apresentaram efeitos negativos sobre a viabilidade e a capacidade proliferativa das células. O cultivo foi submetido a mais de 11.500 interações com a câmara de bombeamento ao longo do experimento, sem prejuízo aparente para as células.

Durante o experimento, a concentração de glicose no sobrenadante foi monitorada com o auxílio do glicosímetro comercial Accu Check® Active (Roche, Alemanha) e os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da diluição diária do biorreator. Não foi possível realizar replicatas das medições. Alíquotas de 1 mL de sobrenadante foram armazenadas a -20°C e, posteriormente, as concentrações de glicose e lactato foram dosadas no analisador bioquímico YSI 2700 Select Analyzer (Yellow Springs Instruments Inc., EUA). A cada 5 amostras, a medição era realizada em duplicada e o erro associado às medições foi de 1,3% para concentração de glicose e 0,8% para concentração de lactato.

A comparação entre os valores obtidos para concentração de glicose pelas duas metodologias pode ser observada na Figura 4.20.

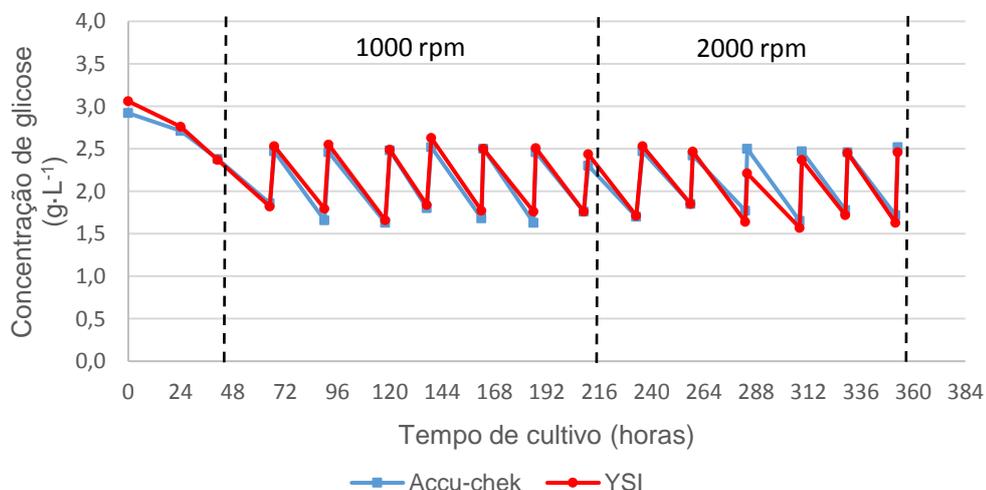


Figura 4.20. Comparação entre valores obtidos para concentração de glicose com os equipamentos Accu chek e YSI 2700.

A variação média entre os valores obtidos pelas duas metodologias foi de apenas 3%, o que possibilita a escolha de qualquer uma das metodologias para o monitoramento do cultivo. O equipamento YSI 2700 é um equipamento analítico e apesar da maior robustez das análises, muitas vezes apresenta problemas de manutenção e de fornecimento de insumos no Brasil. É importante poder contar com uma alternativa, como o glicosímetro Accu-chek, cuja aplicação original é o acompanhamento da glicemia de pacientes, mas que se mostrou eficaz no monitoramento de cultivos celulares.

A concentração inicial de glicose no sobrenadante celular foi de $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a estratégia de alimentação do biorreator foi iniciada quando a concentração chegou a $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nas amostragens realizadas antes das diluições subsequentes do biorreator, a concentração de glicose se manteve na faixa de $1,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, atingindo a faixa de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ após a diluição. Desta maneira, foi possível evitar uma queda na viabilidade celular devido ao esgotamento de nutrientes. A concentração inicial de lactato no sobrenadante celular foi de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e durante o cultivo teve média de $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas amostragens anteriores às diluições do biorreator (Figura 4.21).

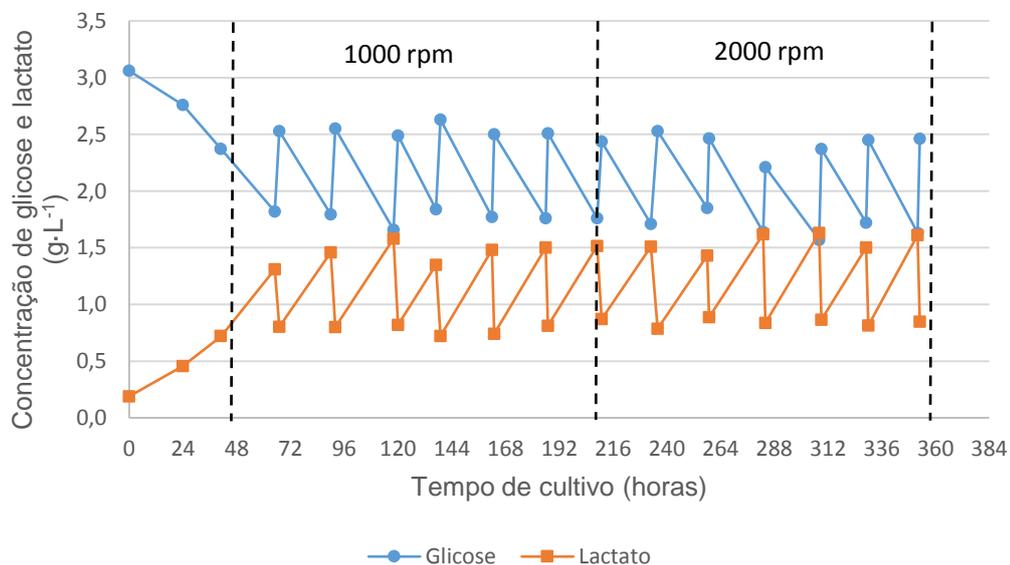


Figura 4.21. Curva de concentração de glicose e de lactato durante o primeiro teste de recirculação contínua, obtidas com o equipamento YSI 2700.

A análise do consumo de glicose mostra uma taxa específica mais elevada nos primeiros dois dias de cultivo, em torno de $2,0 \cdot 10^{-10} \text{ mmol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, quando a disponibilidade do substrato é maior e a concentração de células menor. Nos dias

subsequentes, o consumo se manteve na faixa de $1,0$ a $1,6 \cdot 10^{-10}$ $\text{mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A produção de lactato foi mais elevada apenas nas primeiras 24 h, chegando a $3,8 \cdot 10^{-10}$ $\text{mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Durante o experimento variou entre 2,3 e $3,0 \cdot 10^{-10}$ $\text{mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, sem correlação aparente com o acionamento da bomba PuraLev® 200MU. A taxa média de conversão de glicose em lactato durante o experimento foi de 1,8, ou seja, para cada mol de glicose consumido 1,8 mol de lactato foi liberado no sobrenadante (Figura 4.22). A manutenção do perfil metabólico durante todo o experimento é mais um indicativo de que o acionamento contínuo da bomba PuraLev® 200MU não apresentou efeitos negativos sobre o cultivo celular.

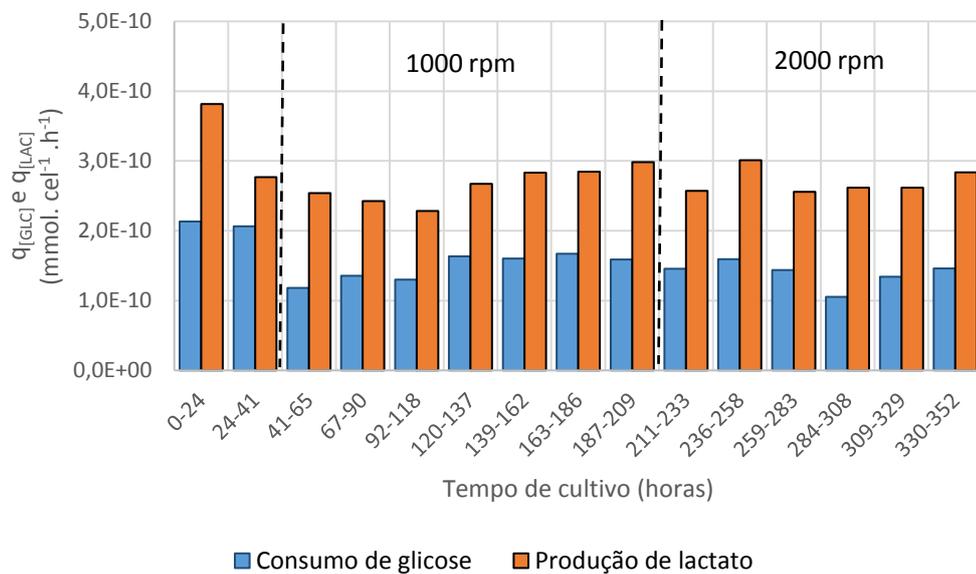


Figura 4.22. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante o primeiro teste de recirculação contínua.

Como até aquele momento não havia sido observado aumento na concentração de células mortas após a exposição ao bombeamento, foi levantada a hipótese de que o estresse mecânico causado pela passagem pela bomba poderia estar lisando as células e a morte poderia estar sendo subestimada. Como tentativa de verificar um possível aumento na lise celular, foi realizada dosagem de proteínas características de células CHO no sobrenadante, denominadas *host cell proteins* (HCP).

Como é possível observar na Figura 4.23, a concentração de HCP no sobrenadante celular parece acompanhar a concentração de células totais no biorreator. Concentrações celulares entre $15,0$ e $25,0 \cdot 10^5$ $\text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ apresentaram concentração de HCP na faixa de $0,5$ a $1,5$ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Teste adicionais serão

necessários para padronização da análise, mas com os resultados obtidos até o momento, acredita-se que não houve aumento significativo da lise celular devido ao acionamento da bomba. Park e colaboradores (2017) identificaram e quantificaram proteínas de células CHO presentes no sobrenadante do cultivo celular. Ao comparar cultivos em batelada e em batelada alimentada, evidenciaram maior concentração e variedade de proteínas de células CHO durante o cultivo em batelada alimentada, por apresentar maior concentração celular e período de cultivo mais longo.

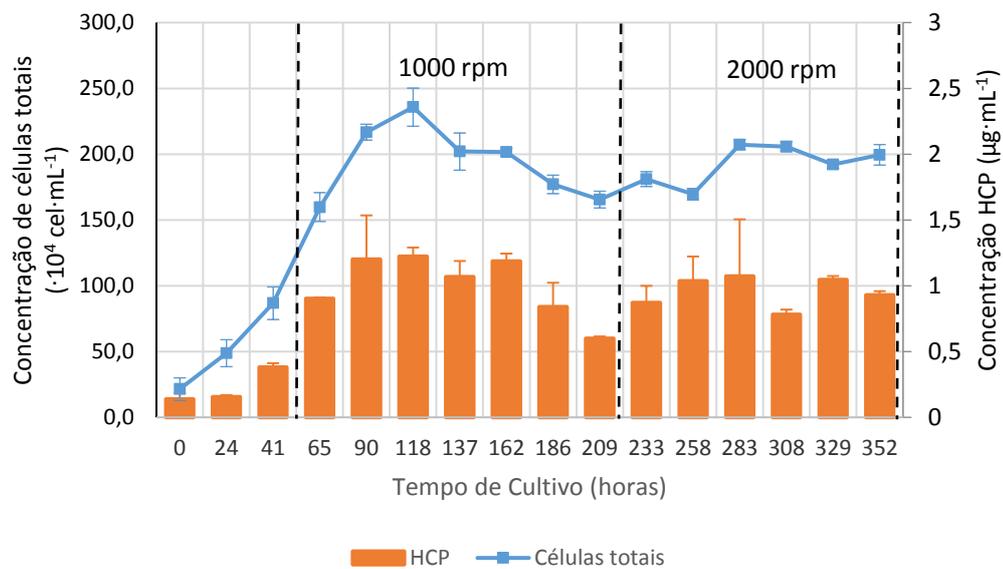


Figura 4.23. Concentração de HCP no sobrenadante celular durante o primeiro teste de recirculação contínua.

A dosagem da proteína recombinante de interesse (EPOhr) foi realizada com todas as amostras retiradas antes das diluições diárias do biorreator, com exceção das amostras dos dois últimos dias de cultivo (Figura 4.24).

Durante as primeiras 65 h de cultivo, é possível observar um aumento gradativo na concentração de EPOhr devido ao acúmulo da proteína no sobrenadante, já que o regime de troca de meio do biorreator ainda não havia iniciado. No momento do inóculo, a concentração obtida foi de $2,7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, chegando a $10,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ após 65 h de cultivo. No período de 90 a 162 h, a concentração de EPOhr se manteve constante, variando entre $9,6$ e $10,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

A partir de 186 h de cultivo, a concentração de EPOhr começou a diminuir, chegando a $6,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ após 209 h de cultivo, antes da mudança de velocidade da bomba. A queda na concentração de EPO no biorreator pode estar relacionada à redução relativa de células no cultivo. Essa redução não parece estar relacionada a

fenômenos de morte celular, mas à estratégia de alimentação, que pode não estar conseguindo reestabelecer a concentração mínima necessária de algum nutriente crítico além da glicose, que foi utilizada como indicador de exaustão do meio. A taxa de diluição foi bastante estável ao longo do cultivo ($0,5 \text{ d}^{-1}$), o que pode ter causado a exaustão de outros componentes críticos não monitorados.

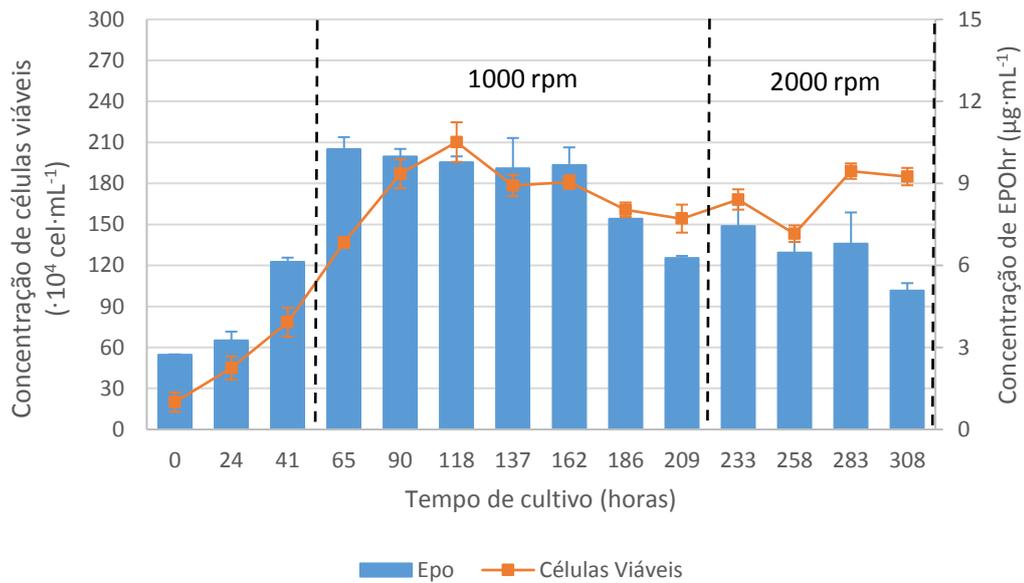


Figura 4.24. Concentração de EPOhr no sobrenadante celular durante o primeiro teste de recirculação contínua.

Na Figura 4.25 está representada a produtividade específica de EPOhr. A maior taxa foi observada no intervalo entre 24 e 41 h ($0,27 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Nos dias subsequentes foi observada uma flutuação nessa taxa, sem associação aparente com acionamento da bomba. Foram observadas variações na faixa entre 0,1 a $0,2 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, com exceção do 13º dia de cultivo, que apresentou produtividade específica de $0,05 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

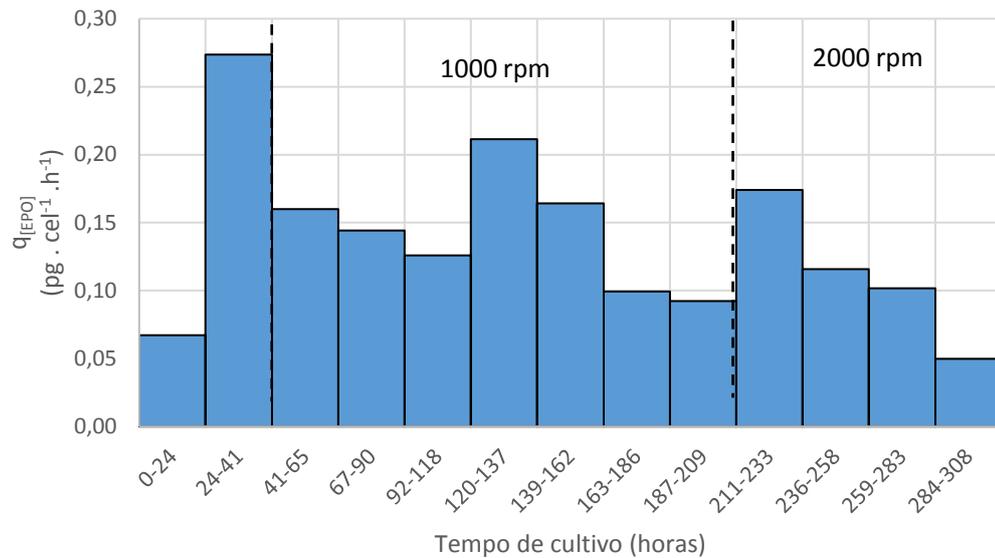


Figura 4.25. Produtividade específica de EPOhr durante o primeiro teste de recirculação contínua.

4.3.2. Teste de recirculação contínua II

O segundo experimento com operação contínua da bomba PuraLev® 200MU teria quatro fases distintas: controle (sem acionamento da bomba) por 10 dias, 1000 rpm por 7 dias, 2000 rpm por 7 dias e 3000 rpm por mais 7 dias. Porém, o experimento foi interrompido 48 horas após o acionamento da bomba com velocidade de 1000 rpm, pois o dispositivo de aquecimento na malha de controle de temperatura do biorreator apresentou mau funcionamento. Os dados referentes à cinética de crescimento celular, durante o segundo teste de recirculação contínua, estão dispostos nas Tabelas 4.14 e 4.15.

Durante as primeiras 52 horas, o comportamento da curva de crescimento foi similar ao observado nos experimentos anteriores, caracterizada por uma fase de adaptação nas primeiras 26 horas e crescimento exponencial entre 26 e 52 horas, com tempo de duplicação de 24,2 h, chegando a concentração de células viáveis de $6,6 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. No entanto, no intervalo entre 52 e 71 horas o tempo de duplicação aumentou para 47,3 h, pois a concentração de células viáveis chegou apenas a $9,1 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, quando o esperado era que nesse período ainda fosse observado aumento exponencial das células (Figura 4.26).

Tabela 4.14. Dados da cinética de crescimento do segundo teste de recirculação contínua.

Tempo de cultivo (h)	Células Viáveis ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Células Mortas ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Células Totais ($\cdot 10^4$ cel·mL ⁻¹)	Viabilidade (%)	Glicose YSI (g·L ⁻¹)	Lactato YSI (g·L ⁻¹)	EPOhr ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Diluição
0	18,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4	19,5 ± 0,0	93,6	3,03	0,139	0,8±0,0	
26	32,5 ± 1,4	2,0 ± 1,4	34,5 ± 0,0	94,2	2,80	0,354	2,0±0,0	
52	68,5 ± 1,4	6,8 ± 1,1	75,3 ± 2,5	91,0	2,43	0,691	4,2±0,0	
71	90,5 ± 16,3	16,0 ± 0,0	106,5 ± 16,3	85,0	2,05	0,968	5,4±0,9	1:1,4
73	76,5 ± 0,7	9,0 ± 0,7	85,5 ± 1,4	89,5	2,54	0,760	3,7*	
95	104,0 ± 6,4	23,0 ± 4,2	127,0 ± 2,1	81,9	2,02	1,190	6,2±0,9	1:1,8
97	54,5 ± 8,5	9,8 ± 4,6	64,3 ± 3,9	84,8	2,54	0,660	3,5*	
119	109,8 ± 18,0	20,3 ± 6,7	130,0 ± 24,7	84,4	2,10	1,130	5,1±0,1	1:1,5
121	69,3 ± 3,9	9,8 ± 0,4	79,0 ± 3,5	87,7	2,51	0,724	3,3*	
143	122,0 ± 19,1	24,5 ± 0,7	146,5 ± 18,4	83,3	2,00	1,200	6,0±0,3	1:1,7
145	74,8 ± 20,2	13,0 ± 1,4	87,8 ± 21,6	85,2	2,54	0,714	3,6*	
167	107,3 ± 1,8	21,3 ± 8,8	128,5 ± 10,6	83,5	2,02	1,170	6,0±0,1	1:1,7
169	54,5 ± 4,2	13,5 ± 0,0	68,0 ± 4,2	80,1	2,53	0,733	3,6*	
190	130,8 ± 4,6	22,3 ± 2,5	153,0 ± 7,1	85,5	1,96	1,210	6,1±0,2	1:2
192	50,3 ± 6,7	13,8 ± 1,1	64,0 ± 7,8	78,5	2,68	0,598	3,0*	
214	114,8 ± 13,8	16,0 ± 2,8	130,8 ± 16,6	87,8	2,18	1,060	4,4±0,1	1:1,5
216	65,5 ± 4,2	13,8 ± 1,8	79,3 ± 6,0	82,6	2,54	0,729	3,0*	
237	132,3 ± 9,5	16,0 ± 2,8	148,3 ± 12,4	89,2	2,06	1,160	7,0±0,3	1:1,7
239	68,8 ± 12,4	13,5 ± 2,8	82,3 ± 15,2	83,6	2,60	0,705	4,2*	
244	72,5 ± 9,9	14,5 ± 3,5	87,0 ± 13,4	83,3	2,50	0,795	4,1±0,3	
261	129,5 ± 3,5	21,5 ± 0,7	151,0 ± 2,8	85,8	2,01	1,240	5,7±0,2	1:1,7
263	75,0 ± 9,2	12,8 ± 2,5	87,8 ± 6,7	85,5	2,48	0,785	3,4*	
285	129,5 ± 0,7	13,3 ± 1,1	142,8 ± 1,8	90,7	1,86	1,360	6,5±0,4	1:2
288	77,8 ± 10,3	9,3 ± 1,1	87,0 ± 11,3	89,4	2,46	0,769	3,2*	

*valores calculados por balanço de massa.

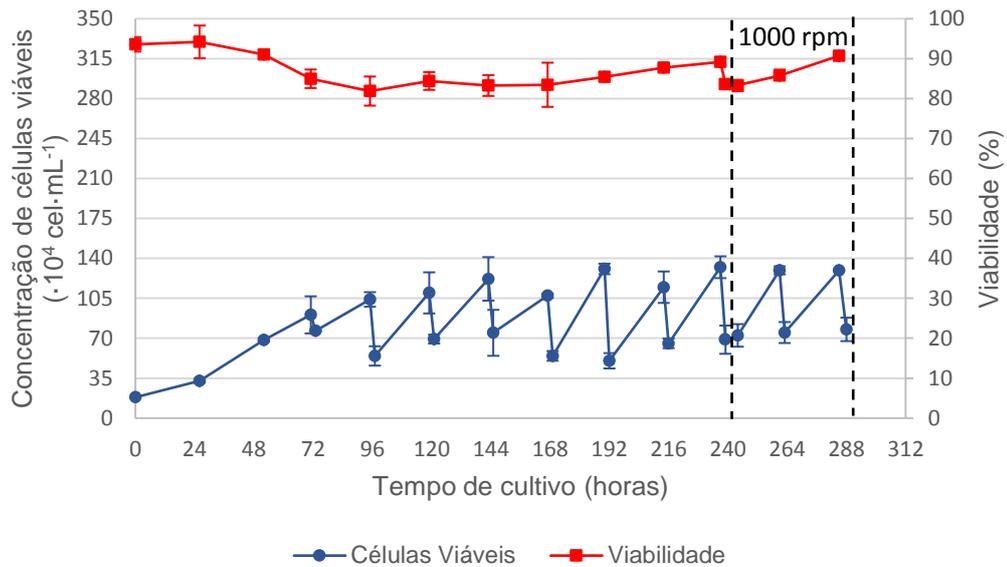


Figura 4.2619. Curva de crescimento e viabilidade celular do segundo teste de recirculação contínua.

A estratégia de alimentação do biorreator, que utilizou a concentração de glicose (obtida com o glicosímetro Accu Chek®) como parâmetro para o cálculo de diluição, foi iniciada com 71 h de cultivo. A primeira diluição foi de 1:1,4, pois a concentração de glicose no sobrenadante foi de $2,21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (dado não mostrado).

No intervalo entre 73 e 95 horas, o tempo de duplicação permaneceu em 49,7 h. Não foi detectada nenhuma alteração nas condições de cultivo, como temperatura, oxigênio dissolvido e agitação, que justificasse o comportamento observado. As taxas de crescimento específico mais baixas (em torno de $0,015 \text{ h}^{-1}$) podem ser consequência de algum problema não detectado ao longo do experimento.

A estratégia de diluição do biorreator foi mantida e no intervalo seguinte (97 – 119 h) a taxa específica de crescimento aumentou para $0,032 \text{ h}^{-1}$, a concentração de células viáveis chegou a $11,0\cdot 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a viabilidade se manteve acima de 80%, sugerindo uma retomada do estado proliferativo do cultivo.

O mesmo perfil foi observado nos dias subsequentes, com taxas específicas de crescimento variando entre $0,026$ e $0,042 \text{ h}^{-1}$, com exceção do intervalo entre 145 e 167 h, que apresentou taxa específica de crescimento de $0,016 \text{ h}^{-1}$. A viabilidade se manteve acima de 80% durante todo o período (0 – 239 h), demonstrando que apesar das variações nas taxas específicas de crescimento, a estratégia de alimentação do biorreator foi satisfatória para manutenção da viabilidade na faixa recomendada.

Tabela 4.15. Taxas específicas, fator de conversão e tempo de duplicação e durante a cinética de crescimento do segundo teste de recirculação contínua.

	Intervalo de tempo (h)	μ (h^{-1})	Td (h)	$q_{[GLC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol \cdot cel $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$)	$q_{[LAC]}$ ($\cdot 10^{-10}$ mmol \cdot cel $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$)	$Y_{[LAC]/[GLC]}$ (mmol \cdot mmol $^{-1}$)	$q_{[EPOhr]}$ (pg \cdot cel $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$)
	0-26	0,022	31,2	1,9	3,6	1,87	0,17
	26-52	0,029	24,2	1,6	2,8	1,82	0,16
	52-71	0,015	47,3	1,4	2,0	1,46	0,08
	73-95	0,014	49,7	1,6	2,3	1,46	0,12
	97-119	0,032	21,8	1,4	2,9	2,14	0,09
	121-143	0,026	26,9	1,3	2,5	1,87	0,13
	145-167	0,016	42,2	1,4	2,6	1,88	0,12
	169-190	0,042	16,6	1,6	2,8	1,70	0,13
	192-214	0,038	18,5	1,6	2,7	1,67	0,07
	216-237	0,033	20,7	1,3	2,3	1,80	0,20
1000 rpm	239-261	0,029	24,1	1,6	2,7	1,69	0,09
	263-285	0,025	27,9	1,5	2,8	1,85	0,14

Após a amostragem realizada com 239 horas, a bomba PuraLev® 200MU foi acionada com velocidade de 1000 rpm (vazão de 0,69 L \cdot min $^{-1}$). Uma nova amostragem foi realizada 5 horas após o acionamento e a viabilidade celular permaneceu em torno de 83%. A bomba recirculou a suspensão celular com a velocidade de 1000 rpm por 48 horas, quando o experimento foi interrompido. Durante essas 48 horas, a viabilidade celular, as taxas específicas de crescimento e tempos de duplicação foram similares aos encontrados no período anterior ao acionamento da bomba. Este resultado confirma o observado no primeiro teste do impacto da recirculação contínua, de que a recirculação da suspensão celular com vazão de 0,69 L \cdot min $^{-1}$ não afeta a capacidade proliferativa e a viabilidade das células testadas, mesmo quando o número de interações com a câmara de bombeamento é muito superior ao normalmente praticado.

A concentração inicial de glicose no sobrenadante celular foi de 3,0 g \cdot L $^{-1}$ e a estratégia de alimentação do biorreator foi iniciada quando a concentração chegou a 2,0 g \cdot L $^{-1}$. Nas amostragens realizadas antes da diluição do biorreator, a concentração de glicose se manteve na faixa de 2,0 g \cdot L $^{-1}$, mais alta que no primeiro teste do impacto

da recirculação contínua, pois a concentração de células viáveis no segundo teste foi menor durante todo o cultivo. Após a diluição, foi mantida a faixa de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A concentração inicial de lactato no sobrenadante celular foi de $0,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e durante o cultivo teve média de $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas amostragens anteriores às diluições do biorreator (Figura 4.27).

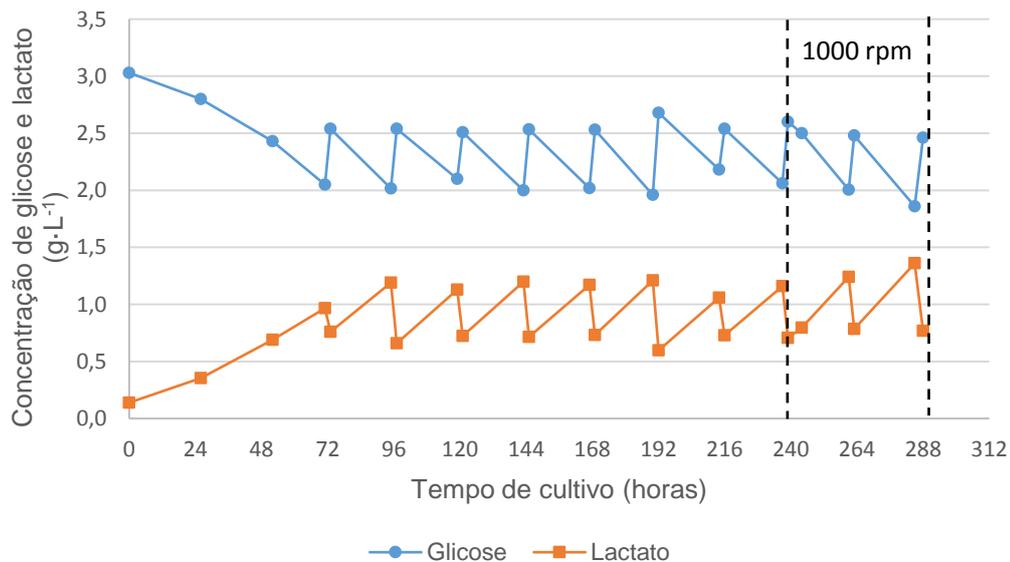


Figura 4.27. Curva de concentração de glicose e de lactato durante o segundo teste de recirculação contínua, obtidas com o equipamento YSI 2700.

Assim como no primeiro teste do impacto da recirculação contínua, a análise do consumo de glicose mostra uma taxa mais elevada no primeiro dia de cultivo, em torno de $1,9 \cdot 10^{-10} \text{ mmol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, quando a disponibilidade do substrato é maior e a concentração de células menor. Nos dias subsequentes, o consumo se manteve em torno de $1,5 \cdot 10^{-10} \text{ mmol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. A produção de lactato também foi mais elevada apenas no primeiro dia de cultivo, chegando a $3,6 \cdot 10^{-10} \text{ mmol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Durante o experimento, a taxa específica de produção de lactato variou entre $2,0$ e $2,9 \cdot 10^{-10} \text{ mmol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Figura 4.28). Não foi observada nenhuma variação no perfil de consumo e produção após o acionamento da bomba PuraLev® 200MU. Assim como no primeiro teste do impacto da recirculação contínua, a taxa média de conversão de glicose em lactato durante o experimento foi de 1,8, ou seja, para cada mol de glicose consumido 1,8 mol de lactato foi liberado no sobrenadante.

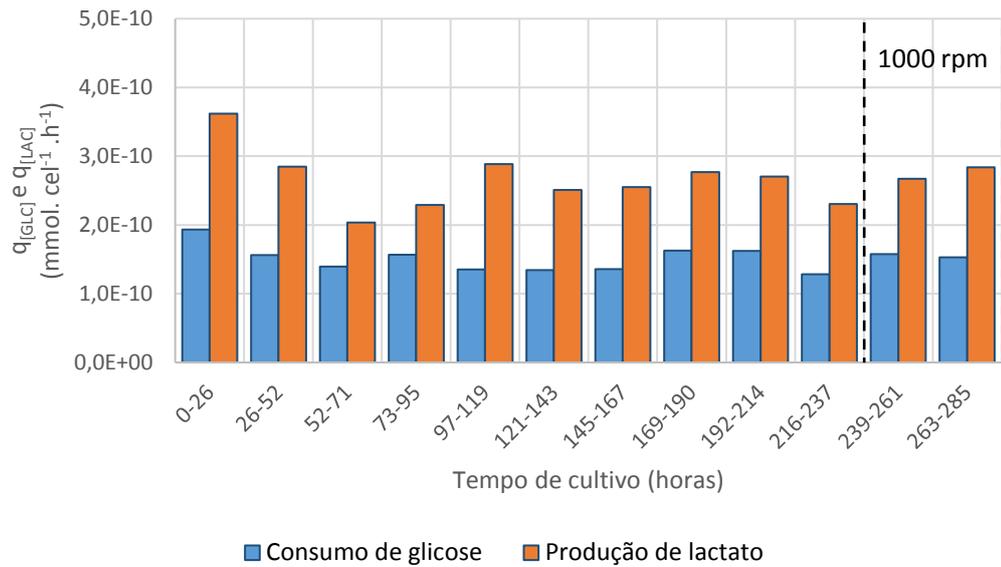


Figura 4.28. Taxas específicas de consumo de glicose e produção de lactato durante o segundo teste de recirculação contínua.

A concentração de proteínas de células CHO no sobrenadante também foi avaliada no segundo teste de recirculação contínua, como tentativa de verificar um possível aumento na lise celular em decorrência do estresse mecânico gerado pelo acionamento da bomba PuraLev® 200MU. A dosagem foi realizada com todas as amostras retiradas antes das diluições diárias do biorreator, com exceção das amostras dos dias 5, 6 e 7, como representado na Figura 4.29

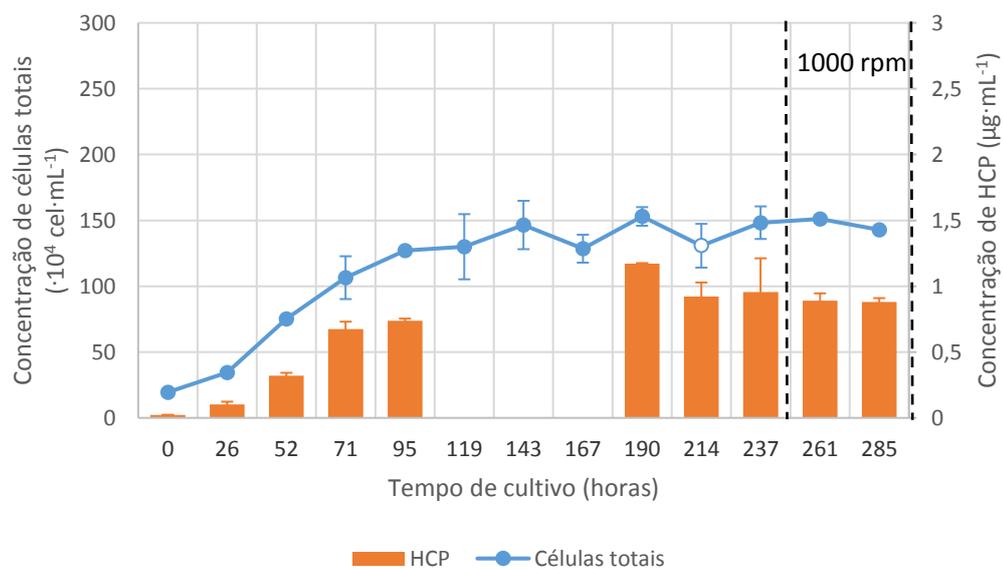


Figura 4.29. Concentração de HCP no sobrenadante celular durante o segundo teste de recirculação contínua.

A concentração de HCP no sobrenadante celular parece acompanhar a concentração de células totais no biorreator, como observado no primeiro teste de recirculação contínua. Concentrações celulares entre $10,0$ e $15,0 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ apresentaram concentração de HCP na faixa de $0,7$ a $1,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Não foi observado aumento na concentração de HCP nas 48 h de acionamento contínuo da bomba PuraLev® 200MU, sugerindo não haver aumento na lise celular provocada pelo bombeamento do cultivo.

A concentração da proteína recombinante de interesse (EPOhr) também foi avaliada por ELISA no segundo teste de recirculação contínua. Desde o momento do inóculo até 72 h de cultivo houve acúmulo da proteína secretada no sobrenadante e, logo em seguida, foi iniciado o regime de alimentação semi-contínua do biorreator, quando parte da massa de proteína produzida é retirada do biorreator durante a diluição.

A concentração inicial foi de $0,8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e chegou a $5,4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ antes da primeira diluição do biorreator. No período de 96 a 192 h, a concentração de EPOhr se manteve constante, na faixa de 5 a $7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, com uma pequena queda na amostragem de 216 h. De maneira geral, as concentrações encontradas, no segundo teste do impacto da recirculação contínua, foram menores que no primeiro teste, no entanto a densidade celular no segundo também foi menor, o que justifica essa diferença (Figura 4.30).

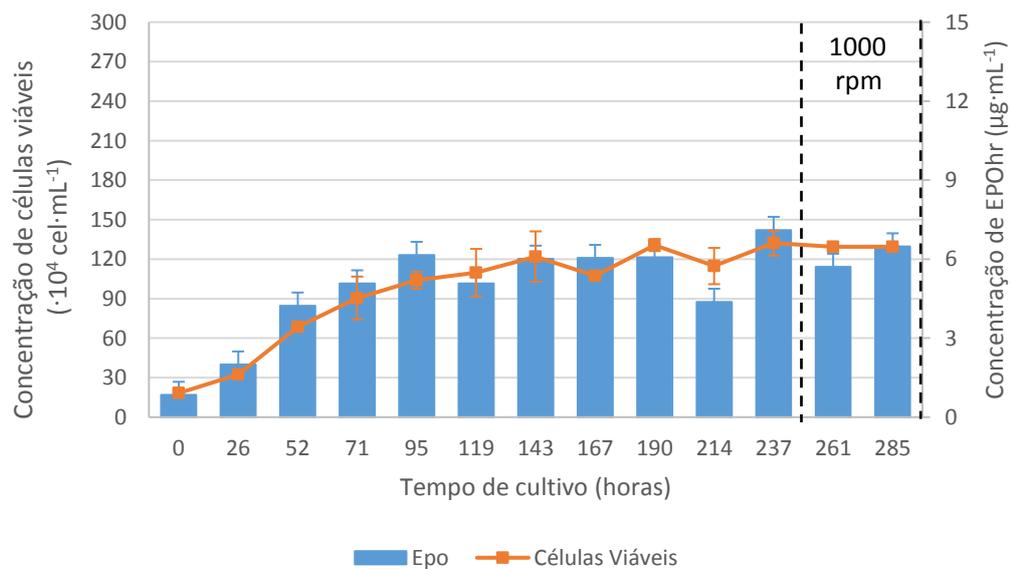


Figura 4.30. Concentração de EPOhr no sobrenadante celular durante o segundo teste de recirculação contínua.

A produtividade específica de EPOhr também foi um pouco mais baixa que a observada no primeiro teste de recirculação contínua, no qual a bomba esteve acionada a maior parte do tempo. Nos dois primeiros dias de cultivo, a produtividade específica foi um pouco superior a $0,15 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Nos dias subsequentes, a taxa variou entre $0,08$ e $0,14 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, com exceção do décimo dia de cultivo, no qual a produtividade chegou a $0,20 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Não foi observada diferença no perfil de produtividade quando comparados os períodos com e sem acionamento da bomba.

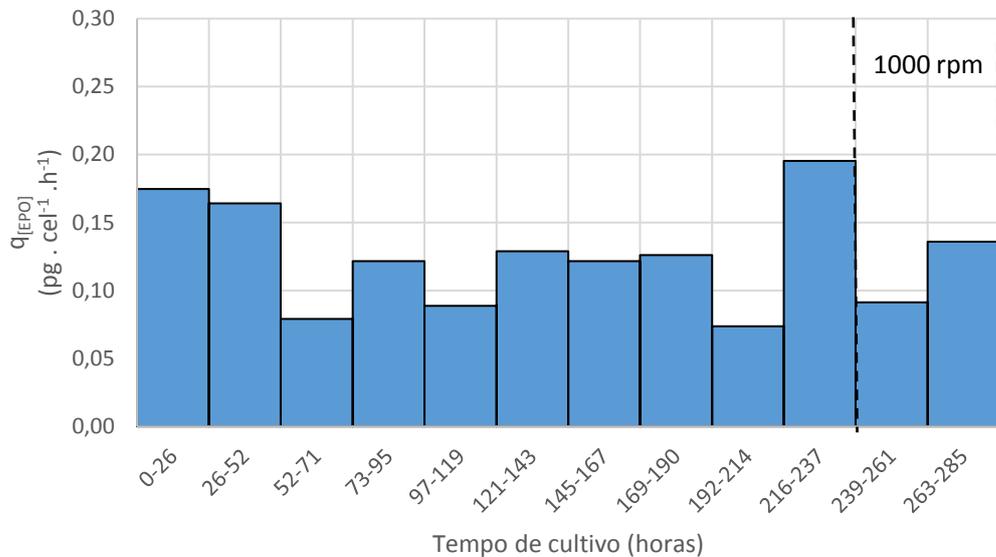


Figura 4.31. Produtividade específica de EPOhr durante o segundo teste de recirculação contínua.

Existem poucos estudos acerca dos possíveis efeitos do bombeamento sobre cultivos celulares, e na maior parte dos casos, foram realizados com microalgas e células sanguíneas (Vandanjon et al. 1999; Alías et al. 2004; Schibilsky et al. 2015). Na literatura existem alguns relatos da utilização de dispositivos para bombeamento sanguíneo em pacientes submetidos a *bypass* circulatório. Luciani e colaboradores realizaram um estudo retrospectivo em 2016 sobre a utilização de bombas centrífugas (com e sem impelidor de acoplamento magnético) na recirculação sanguínea de pacientes neonatos e crianças na Divisão de Cirurgia Cardíaca da Universidade de Verona, Itália. Pacientes que utilizaram o dispositivo com impelidor de acoplamento magnético apresentaram taxa de sobrevida significativamente mais elevada que os pacientes que utilizaram o dispositivo padrão. O tempo médio de utilização dos dispositivos foi de 82 h, chegando a 672 h. Os resultados levam a crer que a ausência de contato do sangue com o eixo do rotor por tempo prolongado minimiza os possíveis efeitos causadores de morbidade, como a hemólise e a ativação da coagulação e do

sistema inflamatório. Resultados observados *in vitro* por Schibilsky et al em 2015, ao comparar os efeitos da recirculação de sangue humano por uma bomba centrífuga axial e por uma bomba centrífuga com impelidor de acoplamento magnético, com vazão aproximada de $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, mostraram que a ativação da coagulação e da inflamação foram significativamente menores com a utilização da bomba centrífuga com impelidor de acoplamento magnético.

Sung e colaboradores (2015) relataram o caso de um paciente que permaneceu 87 dias submetido a *bypass* circulatório, com o emprego de uma bomba centrífuga com rotor de acoplamento magnético, enquanto aguardava transplante cardíaco. A opção pela utilização de uma bomba de fluxo contínuo, e não de fluxo intermitente, foi justificada pela menor incidência de hemorragia e tromboembolismo associados ao dispositivo. O longo período de utilização da bomba corrobora os resultados obtidos no presente estudo, que não identificou efeitos negativos sobre a fisiologia do cultivo celular submetido à recirculação contínua.

Um estudo realizado por Blaschczok e colaboradores em 2013 comparou a utilização de três modelos de bomba centrífuga com rotor de acoplamento magnético, uma bomba peristáltica e uma bomba com diafragma e 4 pistões, na recirculação de um cultivo de células CHO. A vazão de $3,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ foi mantida em todos os testes com todos os dispositivos, com variações na pressão da linha de recirculação e na velocidade do rotor das bombas centrífugas. As bombas centrífugas apresentaram melhor desempenho quando comparadas aos outros dois tipos de bombas testadas, durante recirculação contínua por 15 horas, com base na análise da taxa de morte celular. Assim como no presente trabalho, foram testadas 3 velocidades do impelidor da bomba PuraLev® 200MU, no entanto a vazão foi mantida em $3,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. A viabilidade celular permaneceu acima de 95% durante todo o teste com a velocidade de 1500 rpm. No entanto, com as velocidades de 3500 e 5000 rpm foi observado declínio na viabilidade celular.

4.3.2.1. Avaliações por citometria de fluxo

Alguns ensaios utilizando a técnica de citometria de fluxo foram realizados durante o segundo teste de recirculação contínua da suspensão celular, como a análise do ciclo celular, da viabilidade e de apoptose.

Ciclo celular

O ciclo celular foi monitorado por citometria de fluxo, durante o segundo teste de recirculação contínua, para verificar possíveis alterações na capacidade proliferativa das células após o bombeamento. As análises foram realizadas com as amostras retiradas antes da diluição diária do biorreator. Para fins de comparação, o ciclo celular também foi monitorado em uma cinética em batelada, realizada em frasco estacionário tipo T25.

A exclusão de agregados celulares é primordial para análise do ciclo celular, dado que uma célula com o conteúdo genético duplicado ou duas células passando juntas pelo feixe do laser podem apresentar a mesma intensidade de fluorescência após a marcação com iodeto de propídeo. A exclusão dos grumos foi realizada no software de análise, utilizando os dados obtidos no canal de leitura do iodeto de propídeo (PI) (585/42 nm), com um *dot plot* de PI-A (área do pulso) *versus* PI-H (altura do pulso), como demonstrado na Figura 4.32.

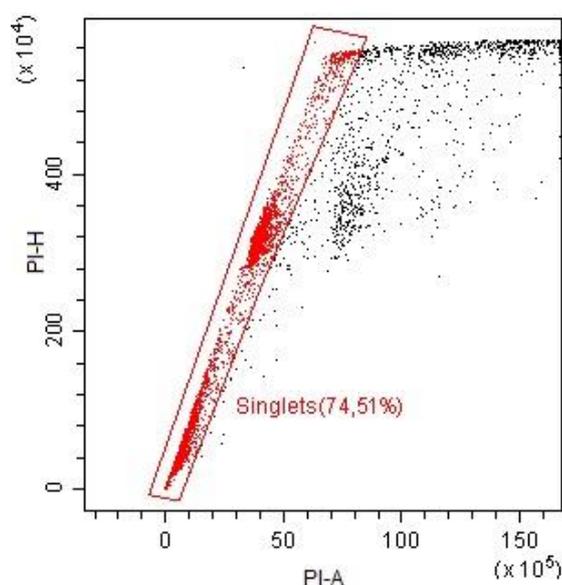


Figura 4.32. Estratégia de análise para exclusão de agregados no software CytExpert. *Dot plot* PI-A (área) *versus* PI-H (altura). *Gate* “singlets” – células únicas. Amostra: cultivo em frasco estacionário T25 marcado com iodeto de propídeo.

O pulso que representa um evento gerado por uma única célula apresenta proporcionalidade entre altura e largura, e conseqüentemente sua área. No entanto, o pulso originado por agregados celulares não obedece essa mesma proporcionalidade. Com isso, é possível distinguir e excluir das análises os eventos que não representam uma célula única.

Após a exclusão de grumos, as amostras foram avaliadas com um histograma de fluorescência do PI (Figura 4.33), onde foi possível observar a presença de uma população, normalmente atribuída a células apoptóticas, localizada à esquerda do pico que representa as células que estão nas fases G₀/G₁ do ciclo celular. Essa população se encontra na região de menor intensidade de fluorescência do histograma, devido à perda de fragmentos de DNA, como descrito por Al-Rubeai et al em 1991 e Bertho et al em 2000. Durante o processo apoptótico, o DNA sofre a ação de endonucleases, resultando em sua fragmentação. O preparo das amostras para a análise de ciclo celular é realizado com detergente para marcação com PI. Este tratamento gera poros na membrana, o que permite a liberação de pequenos fragmentos para o meio extracelular, com isso, a célula perde parte do seu conteúdo genético, resultando em uma menor intensidade de fluorescência. Células mortas em decorrência do processo de necrose, apesar de não apresentarem padrão específico de clivagem de DNA, também podem liberar DNA degradado, gerando eventos com menor intensidade de fluorescência como sugerido por Lecoeur (2002). Por esse motivo, a população sub G₀/G₁, compreendida no *gate* denominado população A (POP A) na Figura 4.33, foi designada, neste trabalho, como *eventos associados à morte celular*. Apesar de não representar exclusivamente a população apoptótica, o aumento desses eventos pode ser utilizado como importante critério para o monitoramento do cultivo.

A Figura 4.33 mostra o acompanhamento dos eventos associados à morte celular durante as amostragens realizadas antes das diluições do biorreator, no segundo teste de recirculação contínua. O *gate* POP A (eventos em azul) compreende os eventos associados à morte celular, enquanto o *gate* denominado população B (POP B), com eventos em vermelho, compreende a distribuição dos eventos nas diferentes fases do ciclo celular. A avaliação do perfil de distribuição dos eventos nas fases G₁/G₀, S e G₂/M está representada na Figura 4.37.

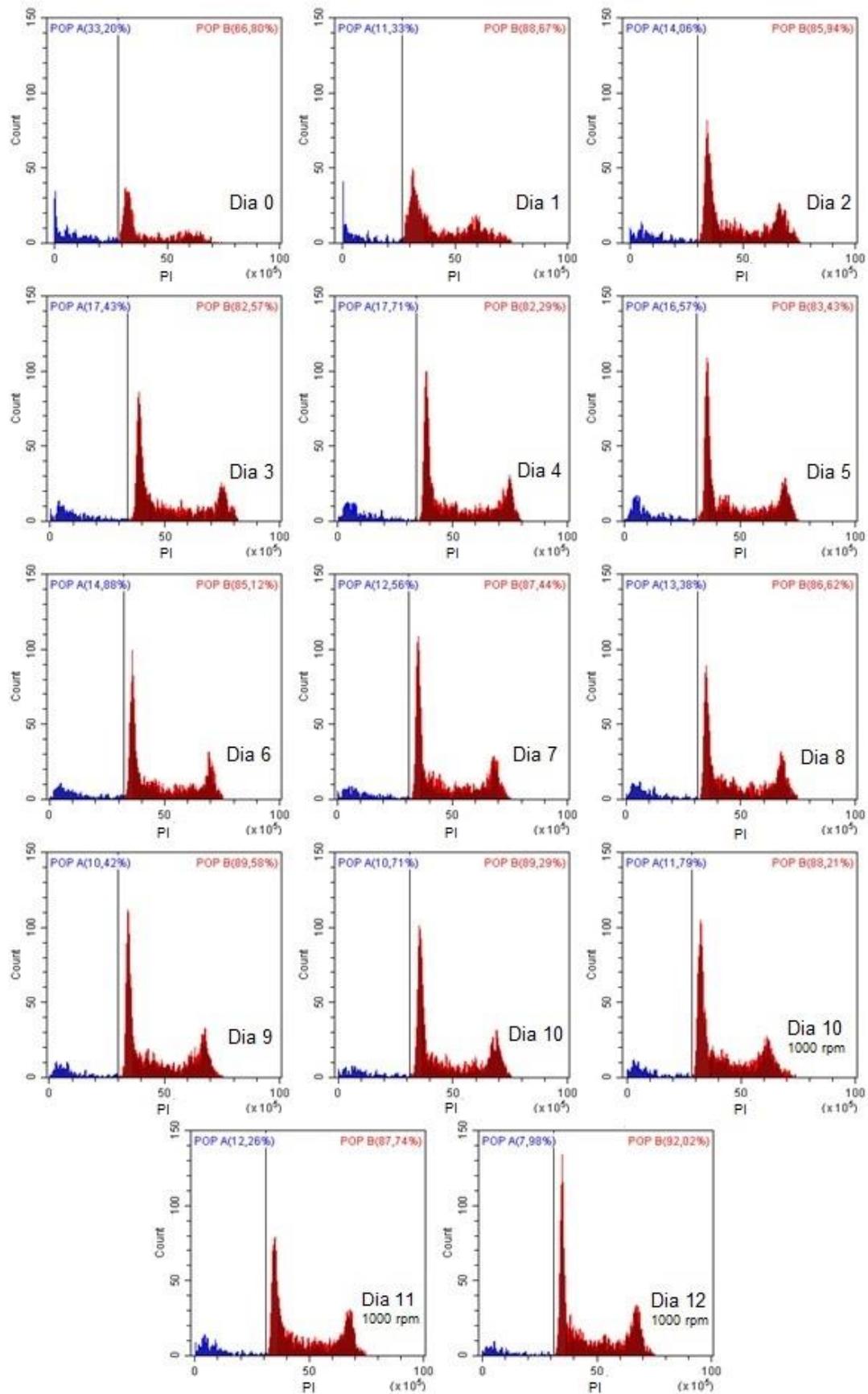


Figura 4.33. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular (*gate* POP B) e os eventos associados à morte celular (*gate* POP A) ao longo do segundo teste de recirculação contínua.

Os percentuais de eventos associados à morte celular, obtidos após análise dos histogramas, estão demonstrados no gráfico da Figura 4.34. Os valores foram comparados aos percentuais de células mortas quantificadas por microscopia com azul de tripano. Com exceção da amostra referente ao momento do inóculo, que apresentou um percentual de eventos associados à morte celular muito superior à quantificação de células mortas por azul de tripano, as duas metodologias obtiveram um perfil muito similar.

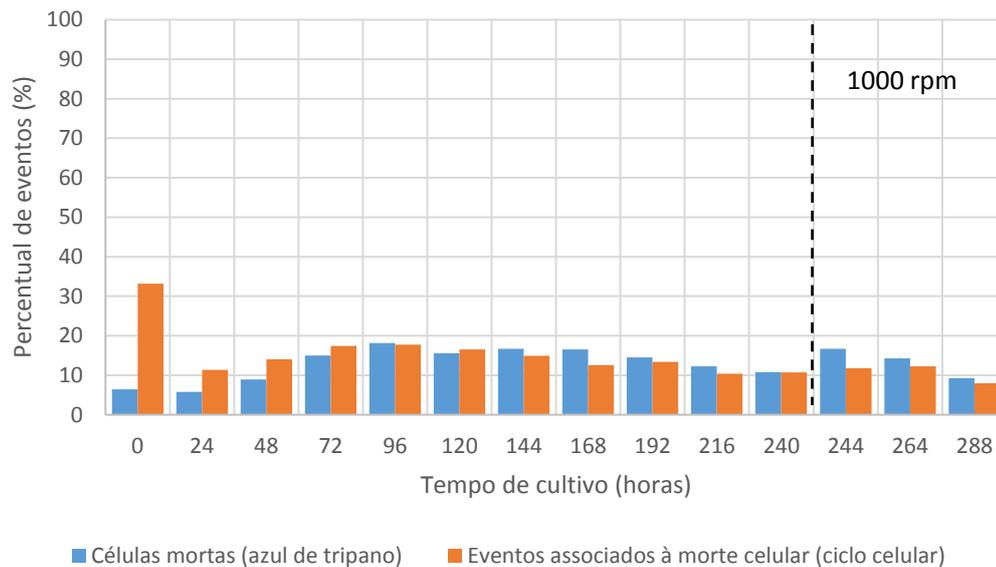


Figura 4.34. Comparação entre percentual de células mortas quantificadas com azul de tripano e eventos associados à morte celular na análise do ciclo celular por citometria de fluxo durante o segundo teste de recirculação contínua.

A Figura 4.34 mostra um aumento no percentual de células mortas, quantificadas por azul de tripano, após o acionamento da bomba. No entanto, na amostragem realizada antes do acionamento da bomba, após a diluição do biorreator, esse percentual já havia aumentado para 16,4%, como é possível observar na Figura 4.26. Portanto, a queda na viabilidade não está associada ao acionamento da bomba.

Para fins de comparação, o ciclo celular também foi monitorado por 10 dias em uma cinética de crescimento em batelada realizada em frascos estacionários tipo T25. Na Figura 4.35, está representado o acompanhamento do perfil do ciclo celular durante essa cinética. O histograma de fluorescência de PI foi subdividido em: população A (POP A), com eventos associados à morte celular, e população B (POP B), representada pelas fases do ciclo celular propriamente ditas.

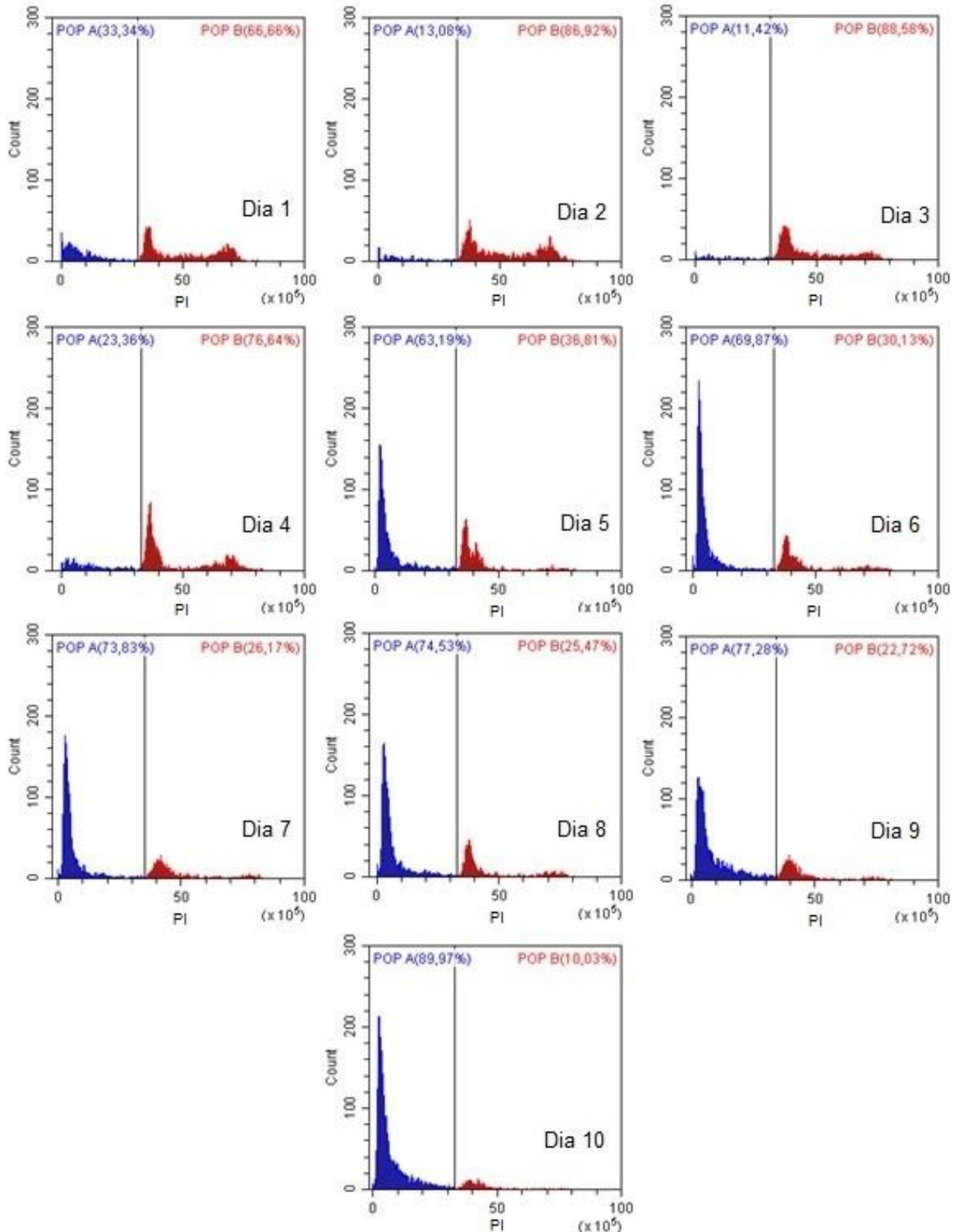


Figura 4.35. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular (*gate* POP B) e os eventos associados à morte celular (*gate* POP A) ao longo de 10 dias de cultivo em batelada em frasco T25.

Os percentuais de eventos associados à morte celular, obtidos após análise dos histogramas, estão demonstrados no gráfico da Figura 4.36. Nas primeiras 24 h

de cultivo, o percentual é de 33,3%. Entre 48 e 96 h o percentual está na faixa de 10 a 30%. A partir de 120 h, o percentual fica acima de 60%, chegando a 90% com 240 h de cultivo. O aumento no percentual de eventos associados à morte celular é condizente com o cultivo em batelada, no qual a privação de nutrientes e o excesso de metabólitos tóxicos afetam a viabilidade do cultivo.

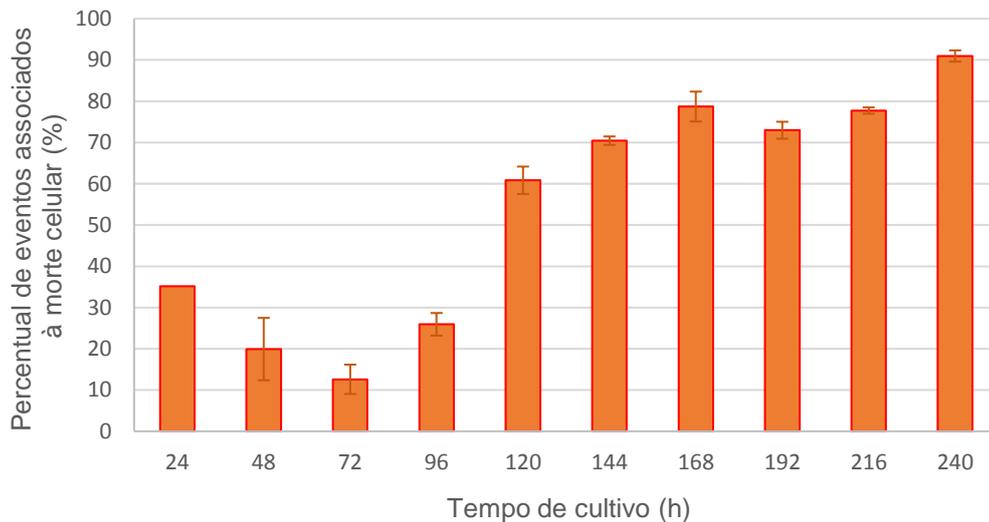


Figura 4.36. Percentual de eventos associados à morte celular, durante análise do ciclo celular por citometria de fluxo, ao longo de 10 dias de cultivo de células CHO em frasco T25, em batelada.

Para análise das fases do ciclo celular, após exclusão dos agregados celulares e dos eventos relacionados à morte, foram criados *gates* para duas grandes subpopulações: G0/G1 e S/G2/M, separando as células comprometidas com a proliferação celular (S/G2/M) das demais. Posteriormente, os eventos na fase S foram separados do pico de células com material completamente duplicado (G2/M). Na Figura 4.37, é possível observar os histogramas com as fases do ciclo celular durante todo o teste do impacto da recirculação contínua II.

Os percentuais correspondentes às fases do ciclo celular durante experimento estão representados no gráfico da Figura 4.38. É possível observar que no momento do inóculo e nas primeiras 24 horas de cultivo, aproximadamente 45% das células estão comprometidas com a proliferação celular. Com 48 horas de cultivo, o percentual aumenta para 54%, e varia entre 55 e 60% durante todo o experimento, até que no último dia chega a 65%.

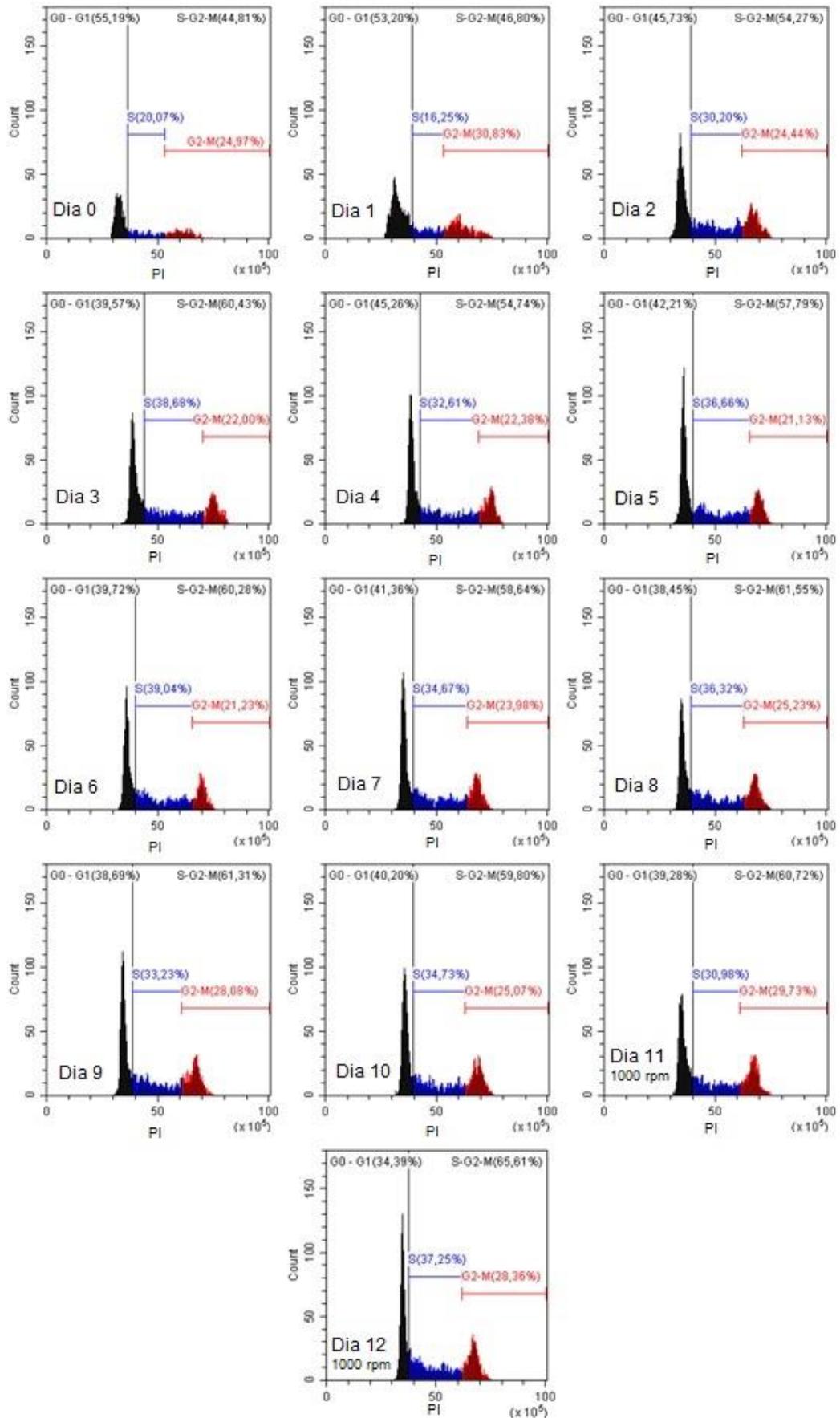


Figura 4.37. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular (*gates* G0/G1, S e G2/M) ao longo do segundo teste de recirculação contínua.

A estratégia de alimentação do biorreator manteve as células em constante estado proliferativo, e o acionamento da bomba não resultou em alteração desse perfil. Alguns trabalhos mostram que células nas fases S e G2/M são mais susceptíveis às tensões de cisalhamento e que o perfil de distribuição das fases do ciclo celular pode ser influenciado pelas tensões de cisalhamento (Al-Rubeai et al, 1995; Chisti, 2001). Como não foi observada redução no percentual de eventos nas fases S/G2/M, acredita-se que o bombeamento não afetou as células que se encontravam nessas fases do ciclo. Outros trabalhos mostram a correlação entre a produção da proteína de interesse e as fases do ciclo celular. De modo geral, a fase G0/G1 está associada a uma maior produtividade, mas isso costuma variar entre linhagens celulares (Lloyd et al, 1999; Park et al, 2016; Sunley e Butler, 2010). Um estudo mais aprofundado do perfil do ciclo celular em diversas condições de cultivo, e sua correlação com a produtividade podem auxiliar a escolha de melhores estratégias de produção.

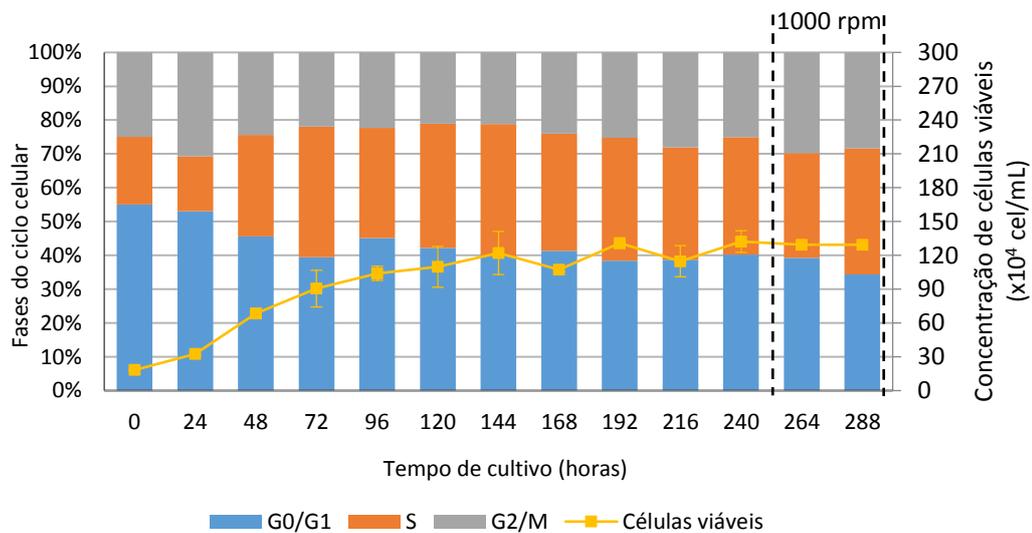


Figura 4.38. Percentual de eventos nas populações G0/G1, S e G2/M ao longo do segundo teste de recirculação contínua.

A mesma avaliação, das fases do ciclo celular, foi realizada para a cinética em frascos estacionários tipo T25, em batelada. Os histogramas de fluorescência do PI referentes ao acompanhamento do cultivo estão dispostos na Figura 4.39.

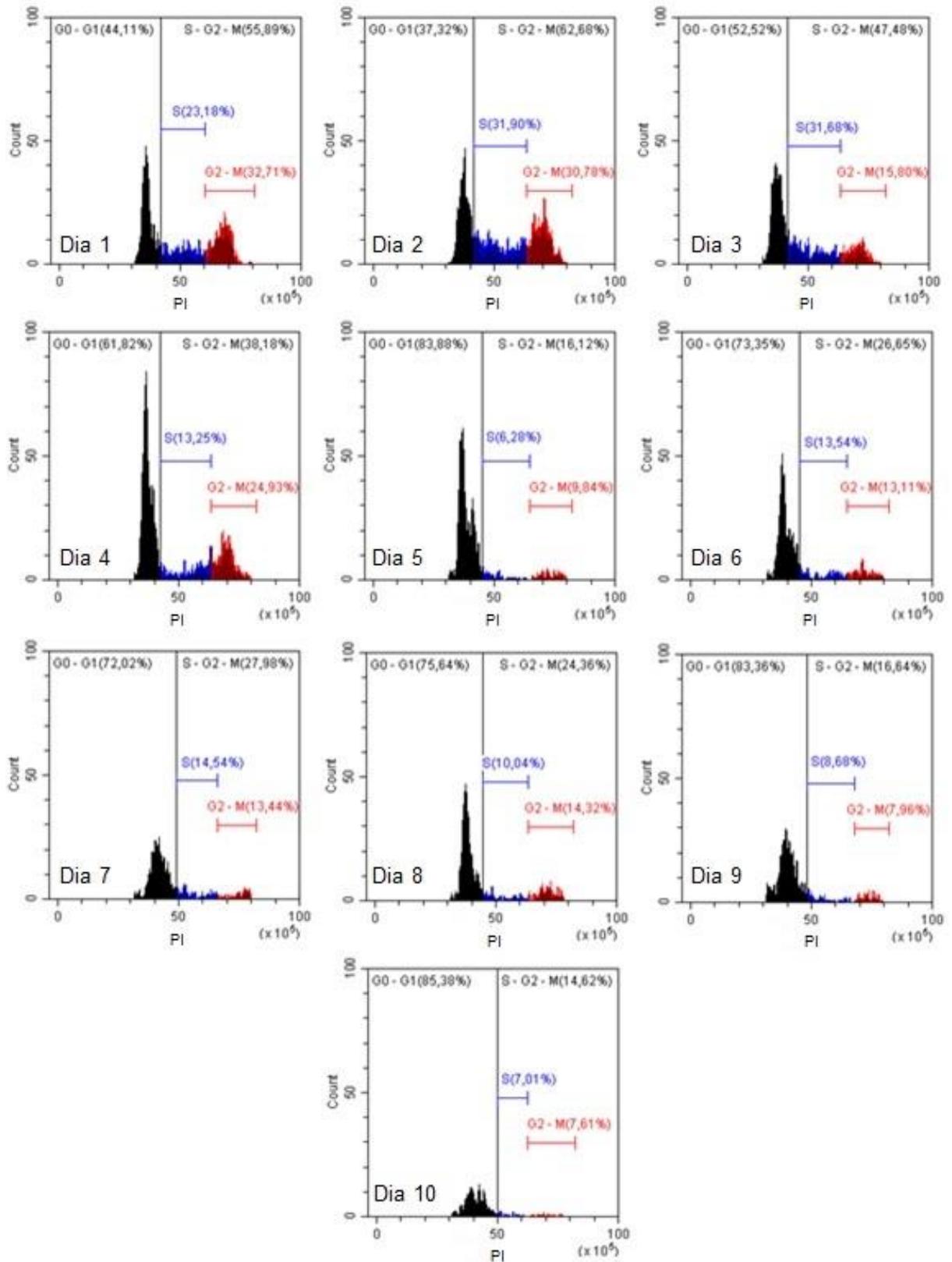


Figura 4.39. Histogramas de fluorescência do PI representando as fases do ciclo celular ao longo de 10 dias de cultivo em frasco T25. *Gates* representam as populações em G0/G1, S e G2/M.

Os percentuais correspondentes às fases do ciclo celular durante a cinética em batelada estão representados no gráfico da Figura 4.40. Na amostragem realizada 24 h após o inóculo, a prevalência é de células nas fases S e G2/M, com mais de 50% das células comprometidas com a proliferação celular, característica típica da fase exponencial do cultivo. Com 48 horas, esse percentual é ainda maior, ultrapassando 60%. A partir de 72 horas de cultivo, é observado um aumento progressivo no percentual de células que permanece na fase G0/G1, começando com 50% e chegando a mais de 80% das células com 120 horas de cultivo. Assim como o aumento dos eventos associados à morte celular, a diminuição do percentual de células comprometidas com a proliferação provavelmente está associada à limitação de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos durante o cultivo em batelada.

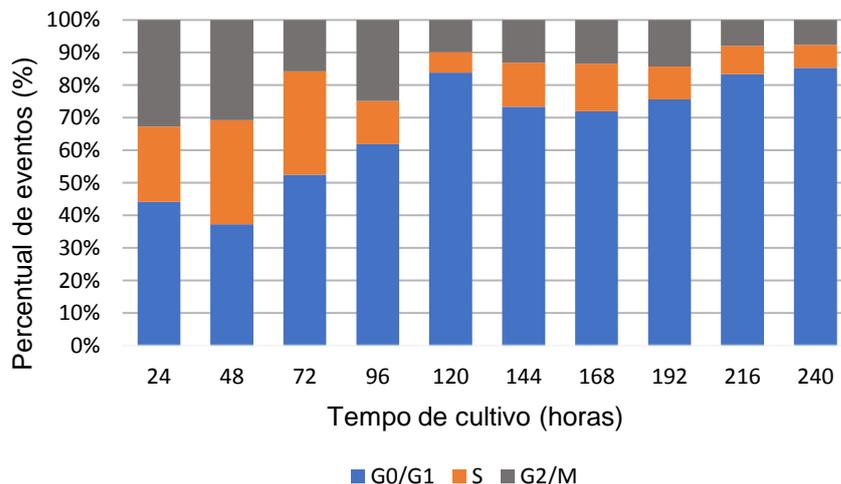


Figura 4.40. Percentual de eventos nas populações G0/G1, S e G2/M ao longo de 10 dias de cultivo em batelada em frascos T25.

Viabilidade celular

O perfil morfológico e a viabilidade das células CHO também foram avaliados por citometria de fluxo durante o segundo teste de recirculação contínua. A partir da análise dos parâmetros complexidade (SSC-A) e tamanho (FSC-A), foi possível destacar duas principais populações: a primeira (POP 1) com células maiores e menos complexas (menos ondulações na membrana celular e/ou grânulos intracelulares) e a segunda (POP 2) com células menores e mais complexas, conforme apresentado na

Figura 4.41. O mesmo perfil morfológico foi observado por Sitton e Srienc (2008) durante monitoramento de células CHO por citometria de fluxo automatizada.

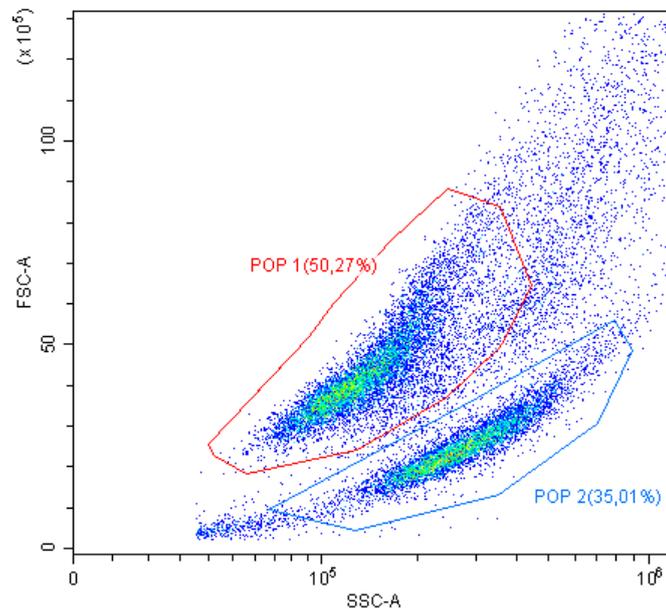


Figura 4.41. *Dot plot side scatter (SSC) versus forward scatter (FSC)* de cultivo controle de células CHO realizado em frasco T25.

A viabilidade celular, por citometria de fluxo, foi avaliada por meio da marcação das células com iodeto de propídeo. Assim como o corante vital azul de tripano, o iodeto de propídeo penetra apenas nas células que perderam a integridade da membrana plasmática. As amostras foram analisadas no canal de leitura do iodeto de propídeo (PI) (585/42 nm), tanto por meio do histograma de fluorescência de PI quanto pelo *dot plot* de fluorescência do PI *versus* tamanho dos eventos (FSC), como é possível observar na Figura 4.42. Foi realizada leitura prévia das amostras não marcadas com iodeto de propídeo, para estabelecimento dos *gates* de análise.

Foi possível observar que a população POP2, de eventos menores e mais complexos, apresentou marcação positiva para PI, em todas as amostras, como demonstrado na Figura 4.43. A perda da integridade da membrana plasmática faz com que os meios intra e extracelular comecem a entrar em equilíbrio, o que diminui o índice de refração do laser que atravessa a célula. Esse dado é interpretado pelo citômetro como um evento de menor tamanho, mesmo que, visualmente, a célula em processo de necrose muitas vezes aparente ser maior que uma célula viável, devido à entrada de água na célula.

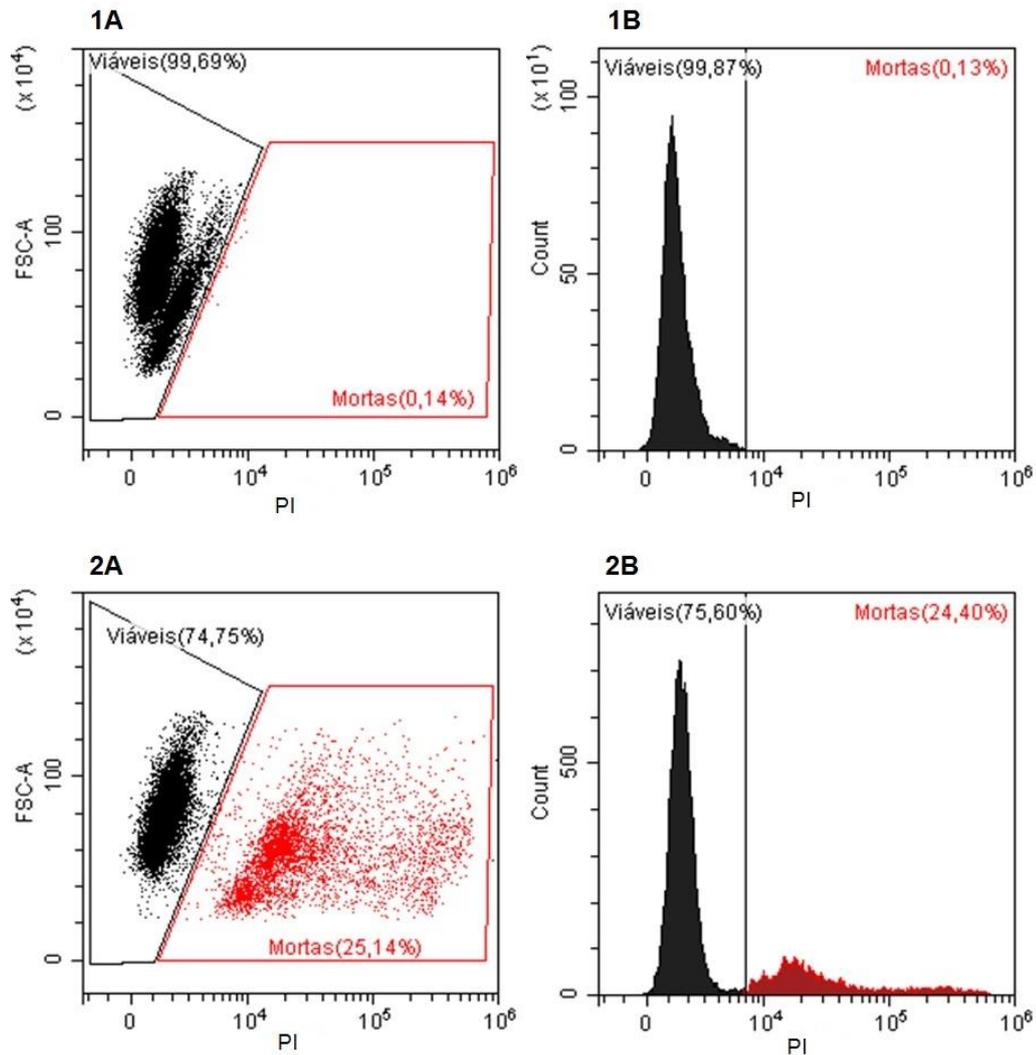


Figura 4.42. (1A) *Dot plot* FSC versus PI de amostra não marcada. (1B) Histograma de fluorescência de PI de amostra não marcada. (2A) *Dot plot* FSC versus PI de amostra marcada com PI. (2B) Histograma de fluorescência de PI de amostra marcada com PI. Amostra: cultivo controle realizado em frasco T25.

Durante o segundo teste de recirculação contínua, foram avaliadas as viabilidades das amostras do 3^o ao 7^o dia de cultivo (sem o acionamento da bomba), do 10^o dia (antes e após o acionamento da bomba) e do 11^o e do 12^o dia (com acionamento da bomba). A viabilidade celular foi calculada a partir do percentual de células positivas para marcação com iodeto de propídeo. O percentual de células encontradas no *gate* POP 2, que considera apenas a morfologia, também foi utilizado para o cálculo de viabilidade e posterior comparação entre metodologias.

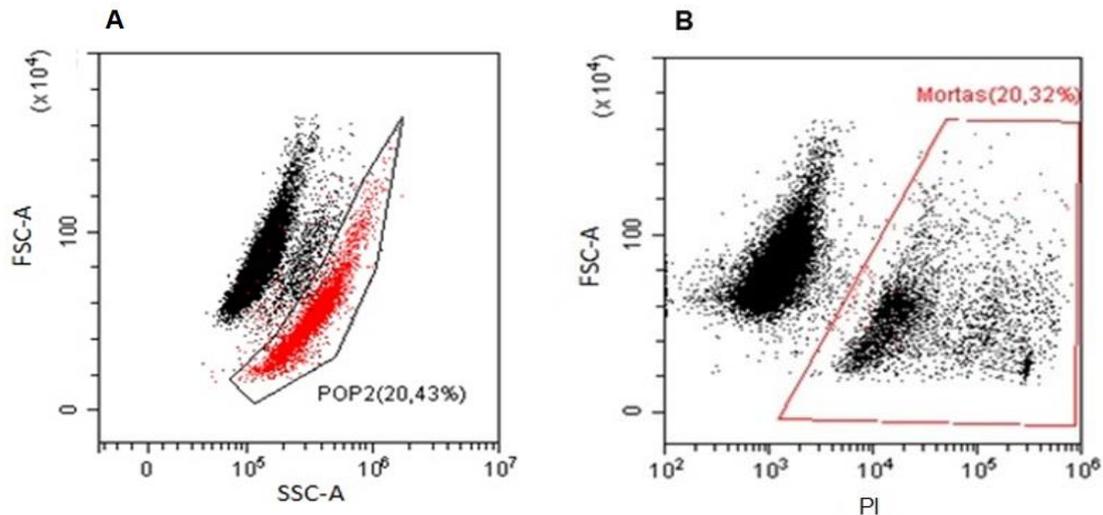


Figura 4.43. (A) *Dot plot* FSC versus SSC de amostra marcada com PI, células em vermelho correspondem ao *gate* de células mortas (PI+), *gate* POP2 compreende população de células menores e mais complexas. (B) *Dot plot* FSC versus PI de amostra marcada com PI, *gate* de células mortas (PI+). Amostra: cultivo controle realizado em frasco T25.

Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 4.15 e na Figura 4.44. Foram comparadas as metodologias de quantificação de células mortas por azul de tripano por microscopia, percentual de eventos associados à morte celular obtido pela análise do ciclo celular, ensaio de viabilidade com marcação de iodeto de propídeo e a avaliação da morfologia das populações obtidas, essas últimas três análises, por citometria de fluxo. A viabilidade obtida por quantificação de células mortas por azul de tripano e a obtida pela análise do ciclo celular obtiveram os resultados mais semelhantes, com variação média de 2,3% entre as duas metodologias.

Tabela 4.16. Comparação da viabilidade celular obtida por diferentes metodologias no segundo teste de recirculação contínua.

	Tempo de cultivo (h)	Azul de tripano (%)	Ciclo celular (%)	Citometria morfologia (%)	Citometria morfologia PI (%)	Citometria PI (%)
	71	85,0	82,57	82,0	70,0	68,9
	95	81,9	82,29	79,0	70,8	69,4
	119	84,4	83,43	79,0	76,6	76,0
	143	83,3	85,12	77,0	79,0	78,8
	167	83,5	87,44	80,0	78,1	77,8
	237	89,2	89,29	85,0	78,2	78,3
1000 rpm	244	83,3	88,21	86,0	79,2	79,4
	261	85,8	87,74	84,0	79,8	80,0
	285	90,7	92,02	86,0	85,8	86,1

Quando são comparadas as metodologias de azul de tripano e avaliação da morfologia por citometria de fluxo, a variação média sobe para 4,7%. Mas ainda assim pode ser considerada baixa, já que a própria metodologia de azul de tripano apresenta uma variação média de 3,6%, neste trabalho, quando a comparação é feita entre as duplicatas técnicas da metodologia. Nenhuma análise feita por citometria de fluxo no segundo teste de recirculação contínua foi realizada em replicata, por esse motivo o gráfico não apresenta barras de erro.

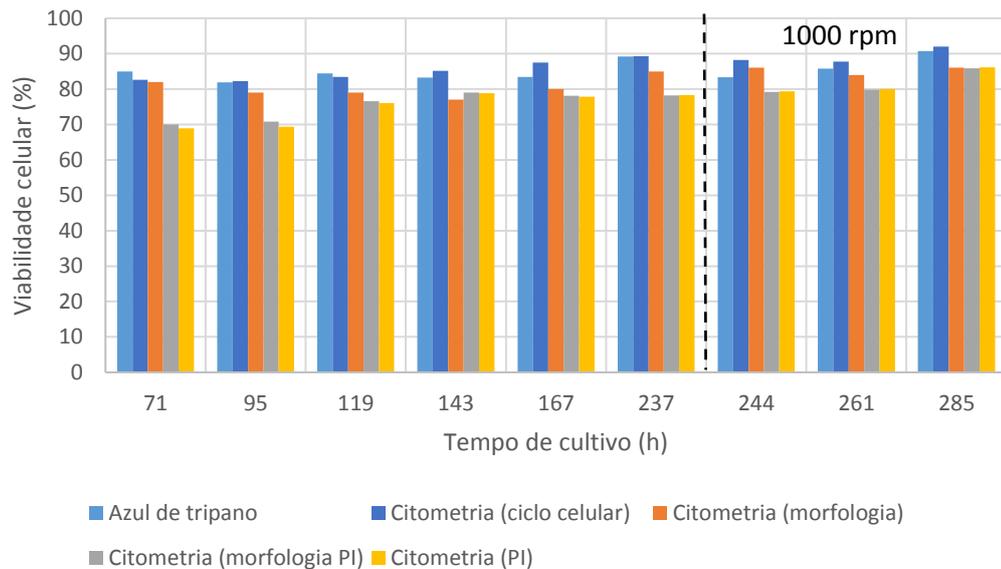


Figura 4.44. Comparação entre percentuais de viabilidade celular obtidos pelas metodologias de microscopia utilizando azul de tripano, e as análises da morfologia em citometria de fluxo da morfologia, marcação com iodeto de propídeo e ciclo celular durante o segundo teste de recirculação contínua.

Ao comparar a avaliação da morfologia, por citometria de fluxo, de uma amostra, com e sem a marcação com iodeto de propídeo, foi observada redução da viabilidade após o protocolo de marcação com iodeto de propídeo. O protocolo conta com uma etapa de centrifugação para troca do meio de cultivo por PBS, e com a incubação da amostra com PI em banho de gelo. A variação média entre a viabilidade das amostras com e sem marcação com PI foi de 6,6%, sugerindo que alguma etapa do protocolo pode estar afetando a viabilidade das amostras. Esse efeito pode ser consequência danos causados à membrana das células, tornando-a permeável a entrada do PI, ou simplesmente, devido à desagregação celular e liberação células mortas do interior dos grumos, como observado por Pinto et al em 2008.

A comparação entre a viabilidade obtida por marcação com iodeto de propídeo e a viabilidade obtida por meio da avaliação da morfologia das populações, ambas por

citometria de fluxo, da mesma amostra, a partir do mesmo tubo, apresentou uma variação de apenas 0,7%. Essa pequena variação sugere que é possível fazer a avaliação da viabilidade apenas utilizando a morfologia, sem a necessidade de marcação com iodeto de propídeo.

Apoptose

As mesmas amostras submetidas à avaliação de viabilidade celular por citometria de fluxo, do 3º ao 7º dia de cultivo (sem o acionamento da bomba), do 10º dia (antes e após o acionamento da bomba) e do 11º e do 12º dia (com acionamento da bomba) também foram avaliadas por citometria de fluxo para detecção de apoptose, por meio da metodologia que identifica a fosfatidilserina presente na membrana plasmática com anexina-V conjugada à ficoeritrina (PE).

O *dot plot* utilizado para análise de apoptose é subdividido em 4 quadrantes. A população de células não marcadas, duplo negativo (-/-), é considerada a população de células viáveis. A população positiva apenas para anexina-V/PE e negativa para 7AAD (+/-) representa as células na fase inicial de apoptose. A população positiva para as duas marcações (+/+) representa as células em apoptose tardia e/ou necrose. A compensação da fluorescência nos dois canais foi realizada com amostras marcadas com cada corante separadamente, como é possível observar na Figura 4.45.

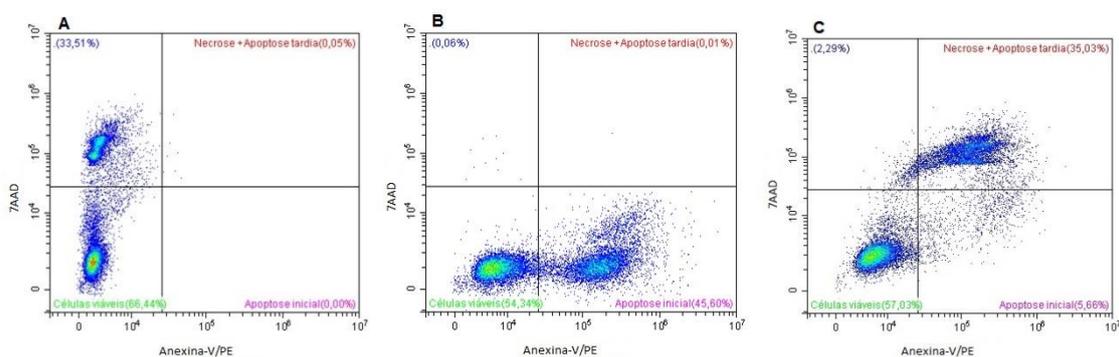


Figura 4.45. *Dot plot* anexina-V/PE versus 7AAD com *gates* para células viáveis, células em apoptose inicial e para células em apoptose tardia e/ou necrose. Amostra: cultivo controle realizado em frasco T25 (A) Marcação simples com 7AAD. (B) Marcação simples com anexina-V/PE. (C) Marcação dupla anexina-V/PE e 7AAD.

Com o objetivo de estabelecer os *gates* que definem as três populações citadas foram utilizadas duas estratégias de controles positivos para as marcações. A primeira

estratégia foi submeter 1 mL de suspensão celular a um estresse extremo, incubando-a a 80°C por 8 minutos, de forma que as células perdessem a integridade da membrana plasmática e fossem positivas para dupla marcação. A segunda estratégia foi utilizar a droga cisplatina, descrita como indutora de apoptose em células CHO por Demarcq (2004), para verificar o aumento da população positiva apenas para marcação com anexina-V/PE, característica de células em apoptose inicial. No entanto, mesmo após testes com diferentes concentrações e tempos de incubação com a droga, foi observado aumento apenas da população referente a apoptose tardia e/ou necrose (Figura 4.46).

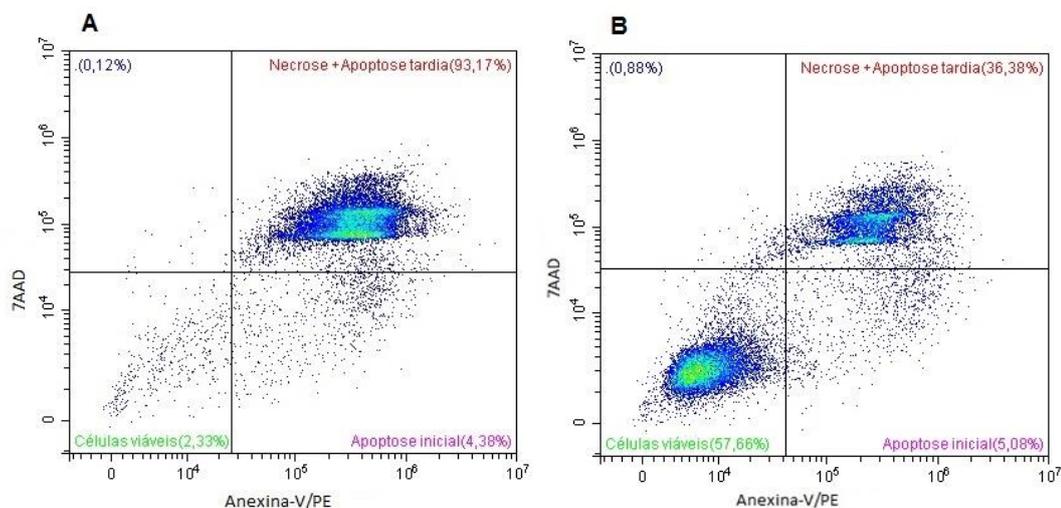


Figura 4.46. Dot plot Anexina-V/PE versus 7AAD com gates para células viáveis, células em apoptose inicial e para células em apoptose tardia e/ou necrose. (A) Perfil observado após aquecimento a 80°C. (B) Perfil observado após incubação com cisplatina.

Durante o segundo teste de recirculação contínua, não foi observada grande variação no percentual de apoptose inicial durante o cultivo, permanecendo na faixa de 5 a 8%, antes ou após o acionamento da bomba (Figura 4.47). O fato pode estar relacionado simplesmente à alta viabilidade do cultivo observada durante todo o período de operação, devido à estratégia de alimentação do biorreator. Limitações da técnica utilizada devem ser consideradas também para a não observação de fenômenos apoptóticos. No entanto, os dados corroboram as informações obtidas por outras metodologias neste trabalho, onde também não foram identificados indícios de ativação da via de morte por apoptose. Kuystermans e colaboradores (2014) monitoraram um cultivo de células CHO por 170 horas, utilizando citometria de fluxo automatizada e a metodologia que emprega anexina-V para detecção de apoptose, e mesmo com a queda do percentual de células viáveis durante o cultivo, a população

referente à apoptose inicial não chegou a 7% em nenhuma amostragem. Portanto, para identificação de morte celular pela via da apoptose, outras metodologias adicionais devem ser realizadas.

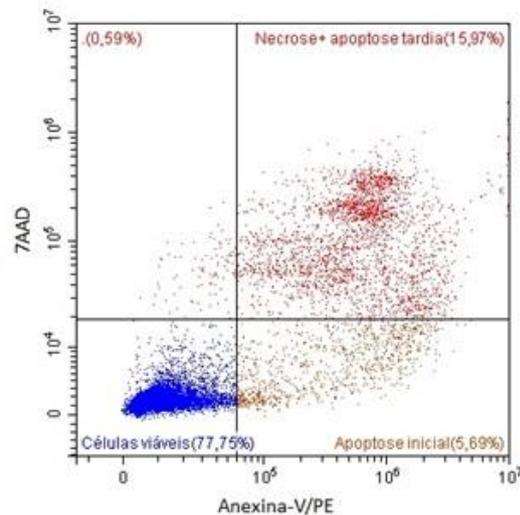


Figura 4.47. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo. *Dot plot* Anexina-V/PE versus 7AAD com *gates* para células viáveis, células em apoptose inicial e para células em apoptose tardia e/ou necrose. Amostra: 12^o dia de cultivo do segundo teste de recirculação contínua (48 h após o acionamento da bomba a 1000 rpm).

A Tabela 4.16 e a Figura 4.48 apresentam os valores percentuais encontrados para cada população durante avaliação de apoptose no segundo teste de recirculação contínua.

Tabela 4.17. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo durante o segundo teste de recirculação contínua.

	Tempo de cultivo (h)	Células viáveis (%)	Apoptose inicial (%)	Apoptose tardia/necrose (%)
	71	56,17	5,01	35,02
	95	65,43	6,45	25,03
	119	67,86	7,76	22,58
	143	69,94	6,94	21,48
	167	65,42	6,33	24,14
	237	63,32	7,39	26,84
1000 rpm	244	69,87	6,66	21,02
	261	74,20	5,84	17,82
	285	77,75	5,69	15,97

O percentual de células viáveis foi menor comparado às outras técnicas utilizadas para avaliação da viabilidade celular. O fato seria compreensível, visto que a maioria das outras técnicas não é capaz de identificar as células em apoptose inicial. No entanto, assim como foi observado para análises de viabilidade utilizando iodeto de propídeo, o protocolo de marcação com os corantes aumentou a população de células mortas avaliadas pela morfologia celular em comparação com as células não marcadas. O protocolo conta com duas etapas de centrifugação para mudança de tampão, e é possível que estas etapas estejam alterando a viabilidade das células. A partir da observação deste fenômeno, novas estratégias de detecção de apoptose devem ser analisadas para que se possa monitorar a fisiologia celular nos cultivos.

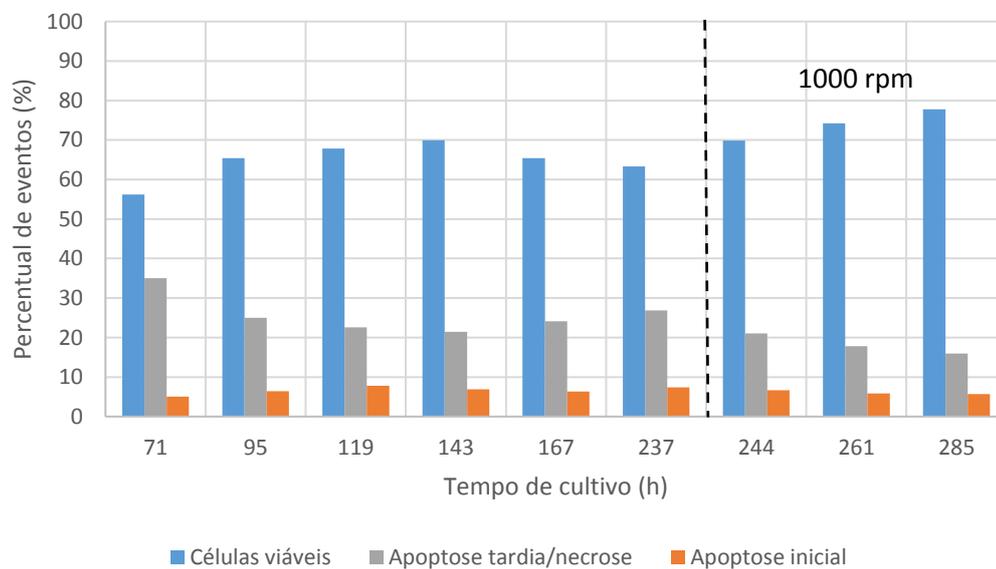


Figura 4.48. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo durante o segundo teste de recirculação contínua.

5. CONCLUSÃO

Em escala laboratorial, com a utilização de um biorreator de 2 L, é possível operar a bomba PuraLev® 200MU na faixa de 1000 a 3000 rpm, na configuração determinada neste trabalho. Esta faixa de velocidade compreende vazões que variam de 0,69 a 3,17 L·min⁻¹, evitando um ambiente hidrodinâmico muito turbulento no interior do vaso.

Experimentos que avaliaram o impacto na fisiologia do cultivo, após 20 interações com a câmara de bombeamento nas velocidades de 1000, 2000 e 3000 rpm, mostraram que a viabilidade celular e a capacidade proliferativa do cultivo não foram afetadas. No entanto, são necessários experimentos adicionais para uma melhor avaliação da operação a 3000 rpm.

A recirculação contínua, nas velocidades de 1000 e 2000 rpm, simulou a utilização de vazões compatíveis com processos industriais, porém a frequência diária de interações do cultivo com a câmara de bombeamento foi muito superior à normalmente praticada. Ainda assim, a viabilidade do cultivo permaneceu acima de 84%, o perfil de consumo de glicose e produção de lactato não foi afetado, o tempo de duplicação celular não ultrapassou 30 horas, evidenciando o estado proliferativo do cultivo, mesmo após mais de 11.000 passagens pela câmara de bombeamento. É possível afirmar, que nestas configurações, a bomba PuraLev® 200MU não afeta a fisiologia das células CHO avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. **Flow cytometry: basic principles and applications**. Crit Rev Biotechnol. 2017;37(2):163–76.
- Alías CB, García-Malea López MC, Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM, García Sánchez JL, Molina Grima E. **Influence of power supply in the feasibility of Phaeodactylum tricornutum cultures**. Biotechnol Bioeng. 2004;87(6):723–33.
- Al-Rubeai M, Emery AN, Chalder S. **Flow cytometric study of cultured mammalian cells**. J Biotechnol. 1991;19(1):67–81.
- Al-Rubeai M, Singh RP, Emery AN, Zhang Z. **Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces**. Biotechnol Bioeng. 1995;46(1):88–92.a
- Al-Rubeai M, Singh RP, Goldman MH, Emery AN. **Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation**. Biotechnol Bioeng. 1995;45(6):463–72.b
- Arden N, Betenbaugh MJ. **Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition**. Trends Biotechnol. 2004;22(4):174–80.
- Baek E, Kim CL, Kim MG, Lee JS, Lee GM. **Chemical inhibition of autophagy: Examining its potential to increase the specific productivity of recombinant CHO cell lines**. Biotechnol Bioeng. 2016;113(9):1953–61.
- Bandaranayake AD, Almo SC. **Recent advances in mammalian protein production**. FEBS Letters. 2014;588(2):253–60.
- Barbone A, Malvindi PG, Sorabella RA, Cortis G, Tosi PF, Basciu A, et al. **6 months of “temporary” support by Levitronix left ventricular assist device**. Artif Organs. 2012;36(7):639–42.
- Barth S, Glick D, Macleod KF. **Autophagy: assays and artifacts**. J Pathol. 2010;221(2):117–24.
- Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. **Flow cytometry in the study of cell death**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(3):429–33.
- Blaschczok K, Kaiser SC, Löffelholz C, Imseng N, Burkart J, Bösch P, et al. **Investigations on Mechanical Stress Caused to CHO Suspension Cells by Standard and Single-Use Pumps**. Chemie Ingenieur Technik. 2013; 85(1-2):144-152.
- Bottrell S, Bennett M, Augustin S, Thuys C, Schultz B, Horton A, et al. **A comparison study of haemolysis production in three contemporary centrifugal pumps**. Perfusion. 2014;29(5):411–6.
- Browne SM, Al-Rubeai M. **Defining viability in mammalian cell cultures**. Biotechnology Letters. 2011;33(9):1745–9.

Butler M, Spearman M, Braasch K. **Monitoring Cell Growth, Viability, and Apoptosis**. In: Pörtner R. (org). *Animal Cell Biotechnology*. Totowa, NJ: Humana Press. 2014; p. 169–92.

Castilho LR, Medronho RA. **Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures**. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2002; 74:129-169.

Castilho LR, Medronho RA. **Processos de separação de células animais**. In: Moraes ÂM, Augusto EFP, Castilho LR. (Org.). *Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. São Paulo: ROCA. 2008; v. 1, p. 269-288.

Chico E, Rodríguez G, Figueredo-Cardero A. **Biorreatores para células animais**. In: Moraes ÂM, Augusto EFP, Castilho LR. (Org.). *Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. São Paulo: ROCA. 2008; v. 1, p. 216-254.

Chisti Y. **Animal cell culture in stirred bioreactors: observations on scale-up**. *Process Biochemistry*. 1993;28(8):511–7.

Chisti Y. **Hydrodynamic damage to animal cells**. *Crit Rev Biotechnol*. 2001;21(2):67–110

Chotteau V. **Perfusion process**. In: Al-Rubeai M (Ed.). *Animal cell culture*. Switzerland Springer: Springer. 2015; p. 407-443.

Chu L, Robinson DK. **Industrial choices for protein production by large-scale cell culture**. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12(2):180–7.

Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J. **Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production**. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2014;34(4):281–99.

Cruz HJ, Ferreira AS, Freitas CM, Moreira JL, Carrondo MJ. **Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture**. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51(5):579–85.

Cruz H, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJT. **Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells**. *Enzyme Microb Technol*. 2000;27(1–2):43–52

Demarcq C, Bunch RT, Creswell D, Eastman A. **The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells**. *Cell Growth Differ*. 1994;5(9):983–93.

Dittler I, Dornfeld W, Schöb R, Cocke J, Rojahn J, Kraume M, et al. **A Cost-effective and Reliable Method to Predict Mechanical Stress in Single-use and Standard Pumps**. *J Vis Exp*. 2015;(102):52-53

Endo Y, Sawasaki T. **Cell-free expression systems for eukaryotic protein production**. *Curr Opin Biotechnol*. 2006;17(4):373–80.

Figueredo-Cardero A, Martínez E, Chico E, Castilho LR, Medronho RA. **Rotating cylindrical filters used in perfusion cultures: CFD simulations and experiments**. *Biotechnol Prog*. 2014;30(5):1093–102.

Fike R, Weiss S, Pomeroy P, inventores. **Spin Filter Perfusion Bioreactor (sfpb) Cell Culture Apparatus**. US patente US5126269 (A), 1992.

Hwang SO, Lee GM. **Nutrient deprivation induces autophagy as well as apoptosis in Chinese hamster ovary cell culture**. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99:678–685

Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos. **Quem somos** [Internet]. [citado 2 de março de 2016]. Recuperado de: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>

Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos. **Campus Manguinhos (RJ)** [Internet]. [citado 8 de março de 2017]. Recuperado de: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/crescimento-institucional/campus-manguinhos-rj>

Jaroszeski MJ, Radcliff G. **Fundamentals of flow cytometry**. *Mol Biotechnol*. 1999;11(1):37–53.

Junker BH, Young JD. **Editorial overview: pharmaceutical biotechnology: engineering cells for high quality biopharmaceuticals production**. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;30:viii – x.

Kacmar J, Srien F. **Dynamics of single cell property distributions in Chinese hamster ovary cell cultures monitored and controlled with automated flow cytometry**. *J Biotechnol*. 2005;120(4):410–20.

Kim YJ, Baek E, Lee JS, Lee GM. **Autophagy and its implication in Chinese hamster ovary cell culture**. *Biotechnol Lett*. 2013;35(11):1753–63.

Kim JY, Kim Y-G, Lee GM. **CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential**. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;93(3):917–30.

Klein T, Heinzl N, Kroll P, Brunner M, Herwig C, Neutsch L. **Quantification of cell lysis during CHO bioprocesses: Impact on cell count, growth kinetics and productivity**. *J Biotechnol*. 2015;207:67–76.

Krampe B, Al-Rubeai M. **Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies**. *Cytotechnology*. 2010;62(3):175–88.

Kuystermans D, Al-Rubeai M. **Bioreactor Systems for Producing Antibody from Mammalian Cells**. In: Al-Rubeai M (Ed) *Antibody Expression and Production*. *Cell Engineering 7*. Springer. 2011;p: 25-52.

Kuystermans D, Avesh M, Al-Rubeai M. **Online flow cytometry for monitoring apoptosis in mammalian cell cultures as an application for process analytical technology**. *Cytotechnology*. 2016;68(3):399–408.

Kuystermans D, Mohd A, Al-Rubeai M. **Automated flow cytometry for monitoring CHO cell cultures**. *Methods*. 2012;56(3):358–65.

Lao MS, Toth D. **Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture.** *Biotechnol Prog.* 1997;13(5):688–91.

Lecoeur H. **Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases.** *Exp Cell Res.* 2002;277(1):1–14.

Lee JS, Lee GM. **Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry.** *Methods.* 2012;56(3):375–82.

Liu B, Spearman M, Doering J, Lattová E, Perreault H, Butler M. **The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody.** *J Biotechnol.* 2014;170:17–27.

Lloyd DR, Holmes P, Jackson LP, Emery AN, Al-Rubeai M. **Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity.** *Cytotechnology.* 2000;34(1-2):59–70.

Lloyd DR, Leelavatcharamas V, Emery AN, Al-Rubeai M. **The role of the cell cycle in determining gene expression and productivity in CHO cells.** *Cytotechnology.* 1999;30(1-3):49–57.

Louis KS, Siegel AC. **Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods.** *Methods Mol Biol.* 2011;740:7–12.

Lyons AB, Doherty KV. **Flow Cytometric Analysis of Cell Division by Dye Dilution.** In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J, Hyun WC, Nolan JP, Orfao A, et al., organizadores. *Current Protocols in Cytometry.* Hoboken, NJ, US: John Wiley & Sons, Inc.; 2004

Maranga L, Goochee CF. **Metabolism of PER.C6 cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels.** *Biotechnol Bioeng.* 2006;94(1):139–50.

Mardikar SH, Niranjana K. **Observations on the shear damage to different animal cells in a concentric cylinder viscometer.** *Biotechnol Bioeng.* 2000;68(6):697–704.

Ministério da Saúde. **Ministério Da Saúde Atrai Investimentos Para a Produção de Biofármacos.** *Blog Da Saúde* 2013. Acessado em 7 de março de 2016. <http://www.blog.saude.gov.br/fdz7le>.

Ministério da Saúde. **Parceria para o Desenvolvimento Produtivo - PDP.** *Portal Da Saúde* 2014. Acessado em 31 de março de 2016. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/581-sctie-raiz/deciis/12-deciis/12090-parceria-para-o-desenvolvimento-produtivo-pdp>

Mollet M, Godoy-Silva R, Berdugo C, Chalmers JJ. **Acute hydrodynamic forces and apoptosis: a complex question.** *Biotechnol Bioeng.* 2007;98(4):772–88.

Ozturk SS, Riley MR, Palsson BO. **Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production.** *Biotechnol Bioeng.* 1992;39(4):418–31.

Park JH, Jin JH, Lim MS, An HJ, Kim JW, Lee GM. **Proteomic Analysis of Host Cell Protein Dynamics in the Culture Supernatants of Antibody-Producing CHO Cells.** *Sci Rep.* 2017;7:44246.

Park JH, Noh SM, Woo JR, Kim JW, Lee GM. **Valeric acid induces cell cycle arrest at G1 phase in CHO cell cultures and improves recombinant antibody productivity.** *Biotechnol J.* 2016;11(4):487–96.

Pellegrini M, Pinto RCV, Castilho LR. **Mecanismos de crescimento e morte de células animais cultivadas *in vitro*.** In: Moraes ÂM, Augusto EFP, Castilho LR. (Org.). *Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.* São Paulo: ROCA. 2008; v. 1, p. 138-169.

Pinto RCV, Medronho RA, Castilho LR. **Separation of CHO cells using hydrocyclones.** *Cytotechnology.* 2008;56(1):57–67.

Pollock J, Ho SV, Farid SS. **Fed-batch and perfusion culture processes: economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty.** *Curr Opin Biotechnol.* 2013;110(1):206-219.

Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. **Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies.** *Mol Cell Biochem.* 2008;307(1-2):249–64.

Schibilsky D, Lenglinger M, Avci-Adali M, Haller C, Walker T, Wendel HP, et al. **Hemocompatibility of Axial Versus Centrifugal Pump Technology in Mechanical Circulatory Support Devices.** *Artif Organs.* 2015;39(8):723–8.

Schwamb S, Munteanu B, Meyer B, Hopf C, Hafner M, Wiedemann P. **Monitoring CHO cell cultures: cell stress and early apoptosis assessment by mass spectrometry.** *J Biotechnol.* 2013;168(4):452–61.

Sitton G, Srienc F. **Mammalian cell culture scale-up and fed-batch control using automated flow cytometry.** *J Biotechnol.* 2008;135(2):174–80.

Sung S-Y, Hsu P-S, Chen J-L, Tsai C-S, Tsai Y-T, Lin C-Y, et al. **Prolonged Use of Levitronix Left Ventricular Assist Device as a Bridge to Heart Transplantation.** *Acta Cardiol Sin.* 2015;31(3):249–52.

Sunley K, Butler M. **Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest.** *Biotechnol Adv.* 2010;28(3):385–94.

Taskin ME, Fraser KH, Zhang T, Gellman B, Fleischli A, Dasse KA, et al. **Computational Characterization of Flow and Hemolytic Performance of the UltraMag Blood Pump for Circulatory Support: computational characterization of ultramag blood pump.** *Artif Organs.* 2010;34(12):1099–113.

Templeton N, Dean J, Reddy P, Young JD. **Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture.** *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(7):2013–24.

Tonso, A. **Monitoramento e controle de cultivos celulares.** In: Moraes ÂM, Augusto EFP, Castilho LR. (Org.). *Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.* São Paulo: ROCA. 2008; v. 1, p. 216-254.

Vandanjon L, Rossignol N, Jaouen P, Robert JM, Quéméneur F. **Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems.** *Biotechnol Bioeng.* 1999;63(1):1–9.

Voisard D, Meuwly F, Ruffieux P-A, Baer G, Kadouri A. **Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells.** *Biotechnol Bioeng.* 2003;82(7):751–65.

Walsh G. **Biopharmaceutical benchmarks 2014.** *Nature Biotechnology.* 2014;32(10):992–1000.

Walsh G. **Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals.** *Drug Discovery Today.* 2010;15(17-18):773–80.

Wang D, Liu W, Han B, Xu R. **The bioreactor: a powerful tool for large-scale culture of animal cells.** *Curr Pharm Biotechnol.* 2005;6(5):397–403.

Warnock JN, Al-Rubeai M. **Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells.** *Biotechnol Appl Biochem.* 2006;45(Pt 1):1–12.

Chee Fung Wong D, Tin Kam Wong K, Tang Goh L, Kiat Heng C, Gek Sim Yap M. **Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures.** *Biotechnol Bioeng.* 20 de janeiro de 2005;89(2):164–77.

Yang M, Butler M. **Enhanced erythropoietin heterogeneity in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level.** *Cytotechnology.* Outubro de 2000;34(1-2):83–99.